

PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO EM
OVELHAS

MARCELO FERREIRA DE ALMEIDA

**PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO EM
OVELHAS**

MARCELO FERREIRA DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Reprodução Animal

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Caliê Castilho

636.308.24
A498p

Almeida, Marcelo Ferreira de
Protocolos de sincronização do estro e ovulação em
ovelhas / Marcelo Ferreira de Almeida. – Presidente
Prudente, 2009.
40 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente
Prudente – SP, 2009.
Bibliografia.

1. Ovinos. 2. Inseminação artificial. 3. Progestágeno.
4. Benzoato de estradiol. 5. eCG. I. Título.

MARCELO FERREIRA DE ALMEIDA

**PROCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO EM
OVELHAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 24 de Agosto de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista -UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof^a Dr^a Gisele Zocal Mingoti
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Araçatuba - SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa, Maria Cecília que, em todos os momentos de realização desta pesquisa, esteve presente e aos meus filhos Pedro e Gabriel, que me ensinam todos os dias a dinâmica da educação e a inspiração a continuar em busca de novas realizações.

A meus colegas Celso, Michel, Luciane e Margarete e minha irmã Eloisa, pelo suporte e indispensável apoio.

A minha mãe Vera e ao meu pai Firmino (em memória), pelo esforço em educar-me dentro de um ambiente de paz, carinho e alegria.

AGRADECIMENTOS

A professora orientadora, Dr^a Caliê Castilho que, com seu jeito soube sempre na grandeza de seus conhecimentos buscar uma palavra simples de estímulo e com isto contribuiu para esta conquista e, ainda, na ampliação de minha visão de mundo e conhecimentos.

A todo corpo docente e em especial a Dr. Marcelo George Mungai Chacur, Prof^a Dr^a Inês Cristina Giometti, Dr. Luís Roberto Almeida Gabriel Filho.

Ao Médico Veterinário MSc Marcelo Zoccolaro Costa, ao aluno de iniciação científica Ângelo Gardim De Cesare, à Dr^a Maria do Carmo Arenales, aos funcionários Rodrigo, Valdo, Gugu, Pita e Cido, à bibliotecária Jakeline Margaret de Queiroz Ortega e a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

A mim ensinou-me tudo.

Ensinou-me a olhar para as cousas.

Aponta-me todas as cousas que há
nas flores.

Mostra-me como as pedras são
engraçadas,

Quando a gente as tem na mão,

E olha devagar para elas.

Fernando Pessoa

RESUMO

Protocolos de sincronização do estro e ovulação em ovelhas

Objetivou-se testar o protocolo hormonal para IATF (inseminação artificial em tempo fixo) com progesterona por 6 dias aplicando-se eCG (gonadotrofina Coriônica Eqüina) ou BE (Benzoato de Estradiol) e indução de estros utilizando-se: esponjas vaginais impregnadas com MAP (acetato de medroxiprogesterona) por 6, 9 e 14 dias ou dose única de $\text{PGF2}\alpha$ ou efeito macho. Experimento 1: No D0 cada ovelha (n=31) recebeu CIDR sendo divididas aleatoriamente em 3 grupos: G-C (controle) CIDR por 9 dias e na retirada $\text{PGF2}\alpha$ + eCG. No G-eCG CIDR por 6 dias + $\text{PGF2}\alpha$ + eCG e no G-BE Benzoato de estradiol 24h após a $\text{PGF2}\alpha$ e a IATF 50 h após a retirada do CIDR. Experimento 2: No dia 0 as ovelhas (n=48) receberam MAP sendo divididas em 2 grupos: G-9 e G-14 MAP por 9 ou 14 dias + $\text{PGF2}\alpha$ na retirada e detecção de estro. Experimento 3: Dividiu-se aleatoriamente as ovelhas (n=151) em 3 grupos: o G-6, cada ovelha recebeu MAP por 6 dias + $\text{PGF2}\alpha$ na retirada; o G-PGF, cada ovelha recebeu $\text{PGF2}\alpha$ e o G-EF apenas introdução de rufiões. No exp. 1 a prenhez no G-eCG (66%) foi maior ($p < 0,05$) que no G-BE (11,1%). No exp. 2 não houve diferenças ($p < 0,05$) no estro, taxa de prenhez ou de concepção. No exp. 3 no G-6 (58%) e G-PGF (39%) a taxa de estro foi maior ($p < 0,05$) que no G-EF (11%). Concluímos ser possível reduzir o tempo de permanência da progesterona usando eCG para IATF em ovelhas.

Palavras-chave: Ovino – Estro; Ovino –Progesterona; Benzoato de estradiol; eCG

ABSTRACT

Protocol synchronization of estrus and ovulation in sheep

The aim of study was to test the hormonal protocol for FTAI (fixed timed artificial insemination) with progesterone for 6 days applying eCG (Equine Corionic Gonadotrophin) or BE (Estradiol Benzoate) and induction of estrus using: MAP (acetato de medroxiprogesterone) for 6, 9 and 14 days or a single dose of PGF2 α or male effect. Experiment 1: In D0 each ewe (n = 31) received CIDR being divided into 3 groups: GC (control) CIDR for 9 days and in withdrawal PGF2 α + eCG. In G-eCG CIDR for 6 days PGF2 α + eCG and in G-BE estradiol benzoate 24H after PGF2 α and the FTAI 50H after the withdraw of CIDR. Experiment 2: On day 0 the sheeps (n = 48) received MAP being divided into 2 groups: G-9 and G-14 MAP by 9 or 14 days + PGF2 α in withdrawal and detection of estrus. Experiment 3: divided up the sheeps (n = 151) in 3 groups: the G-6, each ewe received MAP for 6 days + PGF2 α in withdrawal, the G-PGF, each ewe received PGF2 α and G-EF only introducing ruffians. In exp. 1 pregnancy in the G-eCG (66%) was higher (p <0.05) in which G-BE (11.1%). In exp. 2 there were no differences (p <0.05) in estrus, pregnancy rate or design and in exp. 3 in G-6 (58%) and G-PGF (39%) the rate of estrus was greater (p <0.05) than in G-EF (11%). We concluded that is possible to reduce the time of permanence of progesterone using eCG for FTAI in sheep.

Keywords: Sheep – Estrus; Sheep – Progesterone; Estradiol benzoate; eCG

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Métodos de Sincronização e Indução do Estro em Ovinos	12
2.1.1 Efeito Macho	12
2.1.2 Métodos Hormonais	13
2.1.2.1 Progesterona	13
2.1.2.2 Prostaglandina	15
2.1.2.3 Progestágenos e Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG).....	15
REFERÊNCIAS.....	17
3 ARTIGO CIENTÍFICO :PROCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM TEMPO FIXO EM OVELHAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura tem surgido, principalmente nos últimos anos, como uma alternativa bastante interessante para a atividade pecuária, especialmente na produção de carne para o consumo humano e de peles para os mercados interno e externo. Na região Nordeste, tendo em vista a sua adaptabilidade e sua grande importância como fonte protéica de alimentos para as populações carentes, a exploração econômica dos derivados desta espécie torna-se fator importante para a fixação e manutenção do homem no campo, contribuindo, em grande parte, para sua renda mensal. Devido a essa expansão na ovinocultura a busca por incremento genético, visando melhorar a produção de carne e lã, tem aumentado nos últimos anos. A alternativa mais poderosa disponível à genética populacional aplicada é a inseminação artificial (IA). Neste contexto sua adoção pode ser ampliada pelo uso concomitante da sincronização do estro e ovulação (MACHADO; SIMPLÍCIO, 2001). Esta biotecnologia facilita o uso da inseminação artificial (IA) por permitir o manejo do rebanho em blocos, além de proporcionar a concepção em fêmeas fora da estação reprodutiva, aumentar a prolificidade natural, antecipar a puberdade e reduzir o número de serviços por concepção (MACHADO et al., 1996).

2 REVISÃO DA LITERATURA

As fêmeas ovinas de região temperada são poliéstricas estacionais, a estação reprodutiva varia de acordo com a extensão do dia, a raça e a nutrição. Essa estacionalidade é governada pelo fotoperíodo com a atividade estral começando durante o período em que diminui a duração de luz. Desta forma, a atividade reprodutiva sazonal se concentra após o solstício de verão época na qual ocorre aumento na secreção de melatonina pela glândula pineal (BOLAND et al., 1990).

Nas zonas tropicais, onde a variação na luminosidade é menor, a tendência dos ovinos locais é reproduzir-se durante o ano todo. Inclusive, raças estacionais introduzidas nos trópicos perdem sua estacionalidade e gradualmente adquirem o padrão de reprodução característico do novo ambiente. A alta temperatura ambiental e a falta de alimentos podem levar a uma diminuição da atividade sexual por alguns meses do ano nos trópicos, porém, logo após o início da estação chuvosa, essa atividade aumenta (HAFEZ, 2004). A estação sexual é influenciada pelo genótipo, sendo assim as raças de ovinos que tem sua origem próxima do equador apresentam estação mais longa, quando comparadas às raças britânicas (HAFEZ, 2004).

A puberdade varia de acordo com a raça e nível nutricional fornecido e ocorre em ovelhas com 4 a 8 meses de idade, pesando 25 a 35 kg de peso vivo, ou seja, 60 a 70% do peso do animal adulto (HAFEZ, 2004).

O ciclo estral dura em média 17 dias e pode ser dividido em duas fases: fase folicular e fase luteal. A fase folicular dura 3 a 4 dias e compreende o intervalo entre a luteólise e a ovulação (KARSCH et al., 1997), enquanto a fase luteal inicia-se quando o CL está se formando e perdura até o momento da luteólise, caso não ocorra gestação. O desenvolvimento folicular em ovinos, à semelhança dos bovinos, ocorre em ondas foliculares que podem ser observadas tanto na estação reprodutiva (GINTHER; WILTBANK, 1995) quanto durante o anestro estacional (BARTLEWSKI et al., 1998) e emergem com intervalo de 4 a 6 dias.

Em ovelhas o cio tem duração de 24 a 36 horas, com sinais pouco pronunciados, apenas edema de vulva e corrimento vaginal, podendo ser

influenciado pela raça, idade, estação reprodutiva e presença ou não do macho (HAFEZ, 2004).

2.1 Métodos de Sincronização e Indução do Estro em Ovinos

Inúmeras vantagens são obtidas com a utilização dos métodos de indução e sincronização do estro em ovelhas. Segundo Henderson et al. (1984), a sincronização do estro oferece ao produtor um grande número de vantagens práticas, tais como: facilidade no manejo, o aproveitamento de pastagens, a otimização do macho e posterior comercialização dos produtos da mesma idade. Além disso, em sistemas intensivos de reprodução que tem como objetivo, partos em bloco ou três partos a cada dois anos, a sincronização de estro em ovinos é imprescindível (GONÇALVES, 2008), sobretudo em raças com estacionalidade reprodutiva bem definida.

Existem vários meios de manipular a estação reprodutiva em ovelhas, dentre eles podemos citar a alteração no fotoperíodo, administração de hormônios ou introdução de carneiros reprodutores em grupos de ovelhas previamente isoladas do macho “efeito macho” (BOLAND et al., 1990).

Para a realização das técnicas de sincronização é preciso levar em consideração a estacionalidade reprodutiva dos ovinos e este fator tem que ser averiguado de acordo com a região do país. Os métodos hormonais podem ser realizados na estação reprodutiva ou mesmo fora, quando os animais estão em anestro, variando apenas quanto ao protocolo a ser usado (GONÇALVES, 2008).

2.1.1 Efeito macho

Este processo é utilizado com o intuito de antecipar em torno de um mês a manifestação de estro em relação à estação reprodutiva e é realizado com a separação de ovelhas em anestro por cerca de 15 dias, quando então os machos são re-introduzidos no rebanho e em aproximadamente 24 a 60 horas as fêmeas

apresentam ovulação (BICUDO, 2004). É bem conhecido que a resposta das ovelhas ao efeito macho é mediado por ferômonios e comportamento sexual demonstrado pelo macho (ROSA et al., 2000), os quais parecem inibir ou reverter os efeitos do fotoperíodo na secreção dos pulsos de LH.

Martin et al. (1983) observaram em ovelhas no anestro, não tratadas com P4, aumento na concentração plasmática de LH de 0,68 ng/mL para 4,49 ng/mL após apenas 20 minutos de exposição ao macho. Porém, em algumas ovelhas, o CL formado na primeira ovulação é aparentemente normal, entretanto, a segunda ovulação e o primeiro estro são observados em torno de um ciclo após a exposição ao macho. No restante das ovelhas, o primeiro CL regride prematuramente, e a segunda ovulação é observada aproximadamente 6 dias após a primeira, porém o cio só irá ocorrer na terceira ovulação após 17 dias (GONÇALVES, 2008).

Na ausência da pré-exposição a progesterona as ovelhas raramente demonstram cio no momento da primeira ovulação (MARTIN; SCARAMUSSI, 1983). Gofrey et al. (1997) observaram que a exposição a progesterona por 12 dias antes da colocação do macho induziu cio em 3 dias em 100% das ovelhas após o efeito macho, mas somente 37,9% das fêmeas controle exibiram comportamento estral. Além disso, a associação de progestágeno previamente à exposição do macho, pode evitar os ciclos curtos (MIES FILHO, 1975), aparentemente atrasando o pico de LH (PEARCE; MARTIN, 1985). O pré-tratamento com progesterona em ovelhas no anestro não impediu o aumento de LH, mas atingiu nível menor (1,38 ng/mL), quando comparado ao grupo sem progesterona (4,49 ng/mL), 20 minutos após a exposição ao macho (MARTIN et al., 1983).

2.1.2 Métodos hormonais

2.1.2.1 Progesterona

O primeiro hormônio a ser utilizado para a sincronização do cio há seis décadas foi a progesterona (CHRISTIAN; CASIDA 1948 apud KNIGHTS et al.,

2001). Em ovinos, os pessários intravaginais de liberação lenta, impregnados com progesterona ou seus análogos sintéticos (progestágenos) são muito utilizados.

Os pessários são confeccionados com esponjas de alta densidade, impregnados com 50mg de acetato de medroxi progesterona (MAP) ou 40mg de fluoroacetato de progesterona (FGA), que introduzidos no fundo da vagina, liberam o progestágeno lentamente (GONÇALVES, 2008). Existe também um dispositivo interno de liberação de drogas (CIDR) que contém 0,4 g de progesterona natural (KNIGHTS et al., 2002) utilizado de maneira similar à esponja de progestágeno, porém de custo mais elevado. No momento de colocação da esponja são necessários cuidados com higiene do material (espécuro) e aplicação de 0,25 mL de antibiótico (oxitetraciclina) na esponja, para evitar vaginites ou aderências.

É possível obter um controle satisfatório do estro em ovelhas com alto grau de sincronização, onde até 95% das ovelhas do rebanho demonstram estro 24 a 48 horas após a retirada do progestágeno (BOLAND et al., 1990). Embora alta taxa de cio, a fertilidade varia muito (22 a 70%), quando utilizado em ovelhas no anestro (BICUDO, 2004), e está relacionada a vários fatores desde o tipo de protocolo empregado até a qualidade do sêmen (IA ou reprodutor). Um fator importante é o tempo de permanência da progesterona, os primeiros protocolos recomendavam períodos de 12 a 14 dias, porém a alta permanência da esponja induz um período maior de crescimento do folículo e conseqüente envelhecimento do oócito, o mesmo pode ser observado em bovinos (WILT BANK et al., 1996).

A diminuição da permanência da esponja vaginal de progesterona apresenta melhores taxas de concepção, por isso são mais usados. Um estudo recente testou o tratamento curto (6 dias) ou longo (12 dias) com MAP associado ou não a aplicação de eCG e concluíram que a taxa de prenhez foi maior no grupo de 6 dias sem a eCG (83%) quando comparados aos outros grupos que variaram de 58% a 67% (VIÑALES et al., 2001).

Cerca de 90% das ovelhas que recebem o progestágeno manifestam estro em até 4 dias após a retirada das esponjas e, apresentam novo estro após 16-20 dias, caso não tenham sido fecundadas no primeiro serviço. A utilização desta técnica, na estação reprodutiva, apresenta excelente resultado na concentração de cios com boa taxa de fertilidade ao primeiro estro (cerca de 60-65%), permitindo a concepção em 90% das ovelhas em dois serviços efetuados num período de 21 dias. Boland et al., (1990) consideram o uso de progesterona o único método de

sincronização de estro durante a estação reprodutiva a encontrar ampla aplicação prática.

2.1.2.2 Prostaglandina

A ovelha deve estar ciclando e apresentando um corpo lúteo funcional nos ovários, para o uso das prostaglandinas, entre os dias 5 a 14 do ciclo estral, de acordo com Gonçalves (2008). Esta tecnologia deve ser empregada durante a estação reprodutiva, pois o uso da prostaglandina depende do controle da fase do ciclo estral. Esse método induz 60 a 70% de manifestação de cio dentro de 3 a 4 dias, sendo que duas aplicações com 9 a 12 dias de intervalo garante a presença de CL funcional e induz 100% de manifestação de cio após a 2ª aplicação (BICUDO, 2004). A prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) utilizada na forma de análogos sintéticos D-Cloprostenol atuam na lise de corpo lúteo, causando diminuição na concentração plasmática de progesterona, conseqüente aumento no estradiol, manifestação de cio e indução do pico de LH. Gofrey et al. (1997), observaram que a taxa de concepção utilizando-se 2 doses de $PGF2\alpha$ com 10 dias de intervalo foi similar à de ovelhas tratadas com CIDR por 12 dias, porém o CIDR antecipou a manifestação de cio. O uso de $PGF2\alpha$ induz o estro mais espaçado devido à fase de desenvolvimento folicular no momento da aplicação (BICUDO, 2004).

2.1.2.3 Gonodotrofina coriônica eqüina (eCG)

A maioria das ovelhas no período de anestro necessita de indução da ciclicidade para entrar em atividade, desta forma é necessário utilizar hormônios que atuem sobre o sistema reprodutor.

Para realizar a sincronização do estro durante o anestro estacional, é necessário que o progestágeno seja acompanhado da eCG (gonadotrofina coriônica eqüina), também conhecido por PMSG, que atua induzindo desenvolvimento de folículos durante os períodos de inatividade hipofisária. Este protocolo permite

realizar coberturas ou inseminações no período de anestro e 80 a 90% das ovelhas ovulam entre 48 e 80 horas após a retirada da esponja, com as ovulações se concentrando entre 60 e 64 horas (GONÇALVES, 2008).

Husein et al. (1998) avaliaram o tratamento de ovelhas fora da estação reprodutiva (esponja) associado à aplicação de eCG no momento da retirada da esponja e observaram taxa de prenhez de 70%. Cardwell et al. (1998) observaram que a ovulação ocorre em média 70 a 80 horas após a remoção do implante de progestágeno, mantido por 10 dias, com aplicação de 500 UI de eCG no momento da retirada do implante e este tratamento antecipou a ovulação em mais de 10 horas, quando comparado ao grupo que recebeu apenas progesterona.

Em outro estudo, o uso de 500 UI de eCG após retirado do progestágeno mantido por 12 dias, em anestro ou na estação reprodutiva foi testado e observou-se que as ovelhas tratadas com eCG ovularam folículos de várias ondas ao passo que no grupo sem eCG a ovulação foi proveniente da onda final do ciclo. Neste estudo também se constatou que a eCG induziu aumento de E2 durante o período periovulatório, principalmente no anestro, aumentando a sincronização e indução de cio nesta fase (BARRET et al., 2004).

O uso da sincronização deve estar associado a IA, facilitando o manejo em relação à monta natural, a qual necessita de vários machos (GONÇALVES, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi: 1) Testar o uso de protocolos hormonais para IATF utilizando-se progesterona por 6 dias associado a aplicação de eCG ou BE (benzoato de estradiol); 2) Avaliar a taxa e sincronização na manifestação de estros utilizando-se esponja de progestágeno mantidas por 9 ou 14 dias; 3) Testar a taxa e sincronização na manifestação de estros utilizando-se progestágeno por 6 dias ou aplicação de dose única de PGF₂ α ou efeito macho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

BARRET, D. M. et al. Ultrassound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12 days treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and non breeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 15, p. 311-327, 2004.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **J Reprod Fertil.**, v. 113, p. 275-285. 1998.

BICUDO, S. D. **Sistema de acasalamento em ovinos**: monta natural e inseminação artificial. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. FMVZ – UNESP – Botucatu. Disponível em: <www.fmvz.unesp.br/ovinos.htm>. Acesso em: 02 jun. 2004.

BOLAND, M. P.; CROSBY, F.; O'CALLACHAN, D. Artificial control of the breeding season in ewes. **Irish Veterinary Journal**, v. 43, p. 2-6, 1990.

CARDWELL, B. E.; FITCH, G. Q.; GEISERT, R. D. Ultrasonic Evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by PMSG. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2235-2238, 1998.

CURI, P. R. **Metodologia e análise da pesquisa em Ciências Biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. Cap. 11, p. 149-161.

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

GODFREY, R. W.; GRAY, M. L.; COLLINS, J. R. A comparison of two methods of oestrus synchronisation of sheep in the tropic. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 99-106, 1997.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 03. p. 33-52.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri, SP: Manole, 2004. p. 173-178.

HENDERSON, D. D. et al. Oestrus synchronization in ewes: a comparison of prostaglandin F_{2α} and salt with a progestagen pessary. **Anim Prod.**, v. 39, p. 229-233, 1984.

HUSEIN, M. G. et al. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. **Theriogenology**, v. 49, p. 997-1005, 1998.

KARSCH, F. J. et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Requirements for Ovulation. **Biology of Reproduction.**, v. 56, p. 303-309, 1997.

KNIGHTS, M.; BAPTISTE, Q. S.; LEWIS, P. E. Ability of ram introduction to induce LH secretion, estrus and ovulation in fall-born ewe lambs during anestrus. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 15, n. 69, p. 199-209, 2002.

KNIGHTS, M. et al. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewe. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 79, p. 1120-1131, 2001.

MACHADO, R.; SALLES, H.; SIMPLÍCIO, A. A. The application of reproductive technologies in the management of small ruminants genetic resources. In: IGA/ FAO ROUND TABLE ON THE GLOBAL MANAGEMENT OF SMALL RUMINANTS GENETIC RESOURCES, 1996, Beijing. **Proceedings...** Bangkok: FAO Regional Office for Asia and Pacific, 1996. p. 85-101.

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

MARTIN, G. B. et al. Effect of progesterone on the responses of Merino ewes to the introduction of rams during anoestrus. **Aust J Biol Sci.**, v. 36, p. 78-369, 1983.

MARTIN, G. B.; SCARMUZZ, R. J. The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. **J. Steroid. Biochem.**, v. 19, p. 869-75, 1983.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1975. v. 2, p. 750.

PEARCE, D. T.; MARTIN, G. B.; OLDHAM, C. M. Corpora lutea with a short life-span induced by rams in seasonally anovulatory ewes are prevented by progesterone delaying the preovulatory surge of LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 79-84, 1985.

ROSA, H. J. D.; JUNIPER, D. T.; BRYANT, M. J. The effect of exposure to oestrous ewes on rams behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 67, p. 293-305, 2000.

VIÑALES, C. et al. 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.

WILTBANK, M. C. et al. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15., 1996, Oregon. **Proceedings ...** Oregon: American Embryo Transfer Association, 1996. p. 23-44.

1 **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3

4 **Redução do tempo de Permanência do Implante de Progesterona em Protocolos de**
5 **Sincronização do Estro e Ovulação em Ovelhas**

6

7 Almeida, Marcelo Ferreira de¹; Costa, Marcelo Zoccolaro²; De Cesare, Ângelo
8 Gardim³; Gabriel Filho, Luiz Roberto de Almeida⁴; Castilho, Calié^{5*}

9 ¹Aluno Mestrado em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente-SP;

10 ²Docente Medicina Veterinária, FEA, Andradina-SP;

11 ³Discente Medicina Veterinária, UNOESTE, Presidente Prudente-SP;

12 ⁴Docente Agronomia, UNOESTE, Presidente Prudente-SP;

13 ⁵Docente Mestrado em Ciência Animal e Medicina Veterinária, UNOESTE, Presidente
14 Prudente-SP;

15 *Autor para correspondência: calie@unoeste.br

16 **REDUÇÃO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DO IMPLANTE DE**
17 **PROGESTERONA EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E**
18 **OVULAÇÃO EM OVELHAS**

21 **Resumo**

22
23 Objetivou-se testar o protocolo hormonal para IATF (inseminação artificial em tempo
24 fixo) com progesterona por 6 dias aplicando-se eCG (gonadotrofina Coriônica Equina)
25 ou BE (Benzoato de Estradiol) e indução de estros utilizando-se: esponjas vaginais
26 impregnadas com MAP (acetato de medroxiprogesterona) por 6, 9 e 14 dias ou dose
27 única de PGF2 α ou efeito macho. Experimento 1: No D0 cada ovelha (n=31) recebeu
28 CIDR sendo divididas aleatoriamente em 3 grupos: G-C (controle) CIDR por 9 dias e na
29 retirada PGF2 α + eCG. No G-eCG CIDR por 6 dias + PGF2 α + eCG e no G-BE
30 Benzoato de estradiol 24h após a PGF2 α e a IATF 50 h após a retirada do CIDR.
31 Experimento 2: No dia 0 as ovelhas (n=48) receberam MAP sendo divididas em 2
32 grupos: G-9 e G-14 MAP por 9 ou 14 dias + PGF2 α na retirada e detecção de estro.
33 Experimento 3: Dividiu-se aleatoriamente as ovelha (n=151) em 3 grupos: o G-6, cada
34 ovelha recebeu MAP por 6 dias + PGF2 α na retirada; o G-PGF, cada ovelha recebeu
35 PGF2 α e o G-EF apenas introdução de rufiões. No exp. 1 a prenhez no G-eCG (66%)
36 foi maior (p<0,05) que no G-BE (11,1%). No exp. 2 não houve diferenças (p<0,05) no
37 estro, taxa de prenhez ou de concepção. No exp. 3 no G-6 (58%) e G-PGF (39%) a taxa
38 de estro foi maior (p<0,05) que no G-EF (11%). Concluímos ser possível reduzir o
39 tempo de permanência da progesterona usando eCG para IATF em ovelhas.

40 **Palavras-chave:** ovino, estro, progesterona, benzoato de estradiol, eCG.

41
42 **Abstract**

43
44 The aim of study was to test the hormonal protocol for FTAI (fixed timed artificial
45 insemination) with progesterone for 6 days applying eCG (Equine Corionic
46 Gonadotrophin) or BE (Estradiol Benzoate) and induction of estrus using: MAP (acetato
47 de medroxiprogesterone) for 6, 9 and 14 days or a single dose of PGF2 α or male effect.
48 Experiment 1: In D0 each ewe (n = 31) received CIDR being divided into 3 groups: GC

49 (control) CIDR for 9 days and in withdrawal PGF2 α + eCG. In G-eCG CIDR for 6 days
50 PGF2 α + eCG and in G-BE estradiol benzoate 24H after PGF2 α and the FTAI 50H
51 after the withdraw of CIDR. Experiment 2: On day 0 the sheeps (n = 48) received MAP
52 being divided into 2 groups: G-9 and G-14 MAP by 9 or 14 days + PGF2 α in
53 withdrawal and detection of estrus. Experiment 3: divided up the sheeps (n = 151) in 3
54 groups: the G-6, each ewe received MAP for 6 days + PGF2 α in withdrawal, the G-
55 PGF, each ewe received PGF2 α and G-EF only introducing ruffians. In exp. 1
56 pregnancy in the G-eCG (66%) was higher (p <0.05) in which G-BE (11.1%). In exp. 2
57 there were no differences (p <0.05) in estrus, pregnancy rate or design and in exp. 3 in
58 G-6 (58%) and G-PGF (39%) the rate of estrus was greater (p <0.05) than in G-EF
59 (11%). We concluded that is possible to reduce the time of permanence of progesterone
60 using eCG for FTAI in sheep.

61 **Keywords:** sheep, estrus, progesterone, estradiol benzoate, eCG.

62

63 INTRODUÇÃO

64

65 A atual expansão da ovinocultura no Brasil traz consigo novos desafios na busca
66 de tecnologias que permitam ao produtor obter melhores resultados na produção e
67 reprodução dessa espécie. O melhoramento genético, uma das bases deste processo,
68 encontra na técnica de inseminação artificial (IA) uma das principais ferramentas, e sua
69 adoção é facilitada pelas técnicas de sincronização de estro e de ovulação visando à
70 inseminação artificial em tempo fixo (IATF) resultando em partições sincronizadas de
71 produtos melhorados. Além disso, permite o manejo do rebanho em blocos, propiciando
72 a concepção fora da estação reprodutiva, aumentando a prolificidade natural,
73 antecipando a puberdade e reduzindo o número de serviços por concepção (Machado;
74 Simplício, 2001).

75 O custo destas tecnologias é um dos principais determinantes para o seu
76 emprego, portanto aprimorar e maximizar seus resultados, bem como diminuir seus
77 custos são desafios que devem ser alcançados. Existem vários meios de manipular a
78 estação reprodutiva em ovelhas, dentre eles podemos citar a alteração no fotoperíodo,
79 administração de hormônios ou introdução de carneiros reprodutores em grupos de
80 ovelhas previamente isoladas do macho, sendo esta manobra denominada “efeito
81 macho” (Boland et al., 1990). Os métodos hormonais podem ser realizados na estação

82 reprodutiva ou mesmo fora desta, quando os animais estão em anestro, variando-se
83 apenas o protocolo a ser usado (Gonçalves et al., 2001).

84 Em ovinos, as esponjas intra-vaginais de liberação lenta, impregnados com
85 50mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) são muito utilizadas. Existe também
86 um dispositivo interno de liberação de drogas (CIDR) que contém 0,4 g de progesterona
87 natural (Knights et al., 2001) utilizado de maneira similar à esponja de progestágeno,
88 porém de custo mais elevado.

89 É possível obter um controle satisfatório do estro em ovelhas com alto grau de
90 sincronização, onde até 95% das ovelhas do rebanho demonstram estro 24 a 48 horas
91 após a retirada do progestágeno (Boland et al., 1990). Um fator importante é o tempo de
92 permanência dos implantes, os primeiros protocolos recomendavam períodos de 12 a 14
93 dias, porém a alta permanência da esponja induz um período maior de crescimento do
94 folículo e conseqüente envelhecimento do oócito, o mesmo pode ser observado em
95 bovinos (Ginther et al., 1996).

96 Um estudo recente testou o tratamento de curta (6 dias) ou longa (12 dias)
97 duração com MAP associado ou não a aplicação de eCG e concluíram que a taxa de
98 prenhez foi maior no grupo de 6 dias sem a eCG quando comparados aos outros grupos
99 (Viñoles et al., 2001). No entanto, para realizar a sincronização do estro durante o
100 anestro estacional, é necessário que o progestágeno seja acompanhado da eCG
101 (gonadotrofina coriônica eqüina), a qual atua induzindo desenvolvimento de folículos
102 durante os períodos de inatividade hipofisária. Este protocolo permite realizar
103 coberturas ou inseminações no período de anestro e 80 a 90% das ovelhas ovulam entre
104 48 e 80 horas após a retirada da esponja, com as ovulações se concentrando entre 60 e
105 64 horas (Gonçalves, 2001). Outro hormônio rotineiramente utilizado é a prostaglandina
106 $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) ou seus análogos sintéticos que induzem lise do corpo lúteo (CL). Esta
107 tecnologia deve ser empregada somente durante a estação reprodutiva, pois a $PGF2\alpha$
108 induz 60 a 70% de manifestação de estro dentro de 3 a 4 dias e o uso de duas aplicações
109 com 9 a 12 dias de intervalo garante a presença de CL funcional e induz 100% de
110 manifestação de estro após a 2^a aplicação (Bicudo, 2004). Ou pode ser usada associada
111 ao protocolo de progestágeno concomitante a aplicação de eCG.

112 O objetivo do presente trabalho foi: 1) testar sincronização da ovulação para
113 IATF utilizando-se progesterona por 6 dias associado a aplicação de eCG ou BE
114 (benzoato de estradiol); 2) avaliar a taxa e sincronização na manifestação de estros
115 utilizando-se esponja de progestágeno mantidas por 9 ou 14 dias; 3) testar a taxa e

116 sincronização na manifestação de estros utilizando-se progestágeno por 6 dias ou
117 aplicação de dose única de PGF2 α ou efeito macho.

118

119

120 MATERIAL E MÉTODOS

121

122 Todos os experimentos foram realizados na região do Oeste Paulista (Latitude
123 22° 07' S e Longitude 51° 23').

124

125 Experimento 1

126

127 Foram utilizadas 38 ovelhas SRD (sem raça definida), durante Janeiro de 2007,
128 com idade variando de 3,0 a 5,0 anos, escore corporal 3,0, (escala variando de 1 a 5)
129 mantidas em pastagem de *Cynodon dactylon* (Tifiton 85) e *Panicum Maximum cv.*
130 (Aruana) com acesso à água e sal mineral *Ad libitum*. Inicialmente, em estágio aleatório
131 do ciclo estral (dia 0), cada ovelha recebeu um dispositivo intravaginal contendo 0,33g
132 de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Brasil). A seguir as ovelhas foram divididas
133 aleatoriamente em 3 grupos (figura1): G-C (grupo controle, n=12) as ovelhas
134 permaneceram 9 dias com o CIDR e no dia da retirada receberam 12mg de Dinoprost
135 (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil) e 300 UI de eCG (Folligon[®], Intervet, Brasil) ambos por via
136 IM. Os Grupos G-eCG (n=13) e G-BE (n=13) tiveram o CIDR removido no dia 6
137 quando todas as ovelhas receberam 12mg de Dinoprost (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil), IM.
138 Neste dia as ovelhas do grupo eCG (n=13) receberam 300UI de eCG (Folligon[®],
139 Intervet, Brasil), IM, enquanto as do grupo BE (n=13) 1mg de Benzoato de estradiol
140 (Estrogin[®], Farmavet, Brasil), IM, 24 horas após a retirada do CIDR, ou seja no dia 7. A
141 inseminação artificial em tempo fixo (IATF), ou seja sem observação de estro, foi
142 realizada por via intra-uterina utilizando-se a técnica de laparoscopia segundo Killen e
143 Caffery (1982), a partir de 50 horas após a retirada do CIDR. Foram utilizadas 2
144 palhetas de sêmen congelado com concentração espermática de 100 milhões por
145 palheta. Trinta dias após a IATF foi realizado diagnóstico de gestação através da ultra-
146 sonografia trans-abdominal (Aloka SSD500, 5,0 MHz, Japão).

147

148

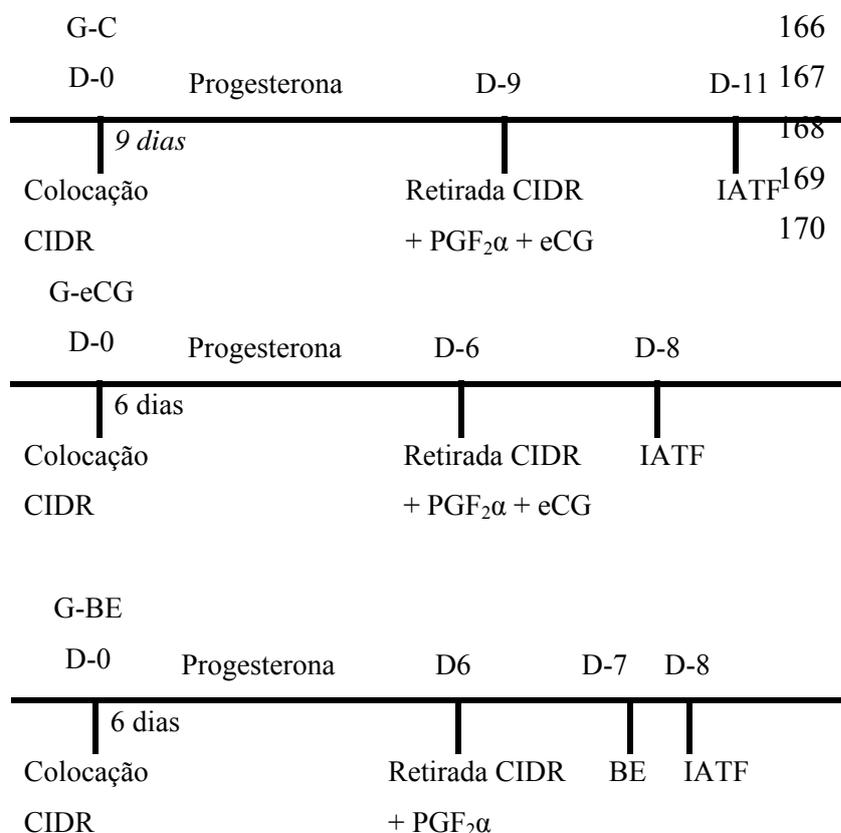
149

150 **Colheita de Sangue e Dosagem Hormonal**

151

152 Foram colhidas amostras de sangue em tubos de 15 mL heparinizados, mantidos
 153 em gelo, por no máximo 1 hora e centrifugados a 750 g durante 15 minutos para a
 154 separação do plasma, o qual foi congelado a -20°C para posterior dosagem de
 155 progesterona pelo método de radioimunoensaio (RIA). As colheitas foram feitas nos
 156 seguintes dias: D0 (dia da colocação do CIDR), no D6 e D7 (nos grupos G-eCG e G-
 157 BE, correspondendo aos dias de retirada do CIDR e 24 h após a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$), no
 158 D9 e D10 (grupo controle) e D17 (nos grupos G-eCG e G-BE) e D20 (grupo controle)
 159 sendo essa última colheita realizada 9 dias após a IATF para verificar a concentração de
 160 progesterona após a ovulação induzida pelo protocolo hormonal. A dosagem da
 161 concentração plasmática de progesterona foi realizada utilizando se um “kit” comercial
 162 (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, CA, USA). Em um ensaio realizado a
 163 sensibilidade foi 0,0049 ng/mL e o coeficiente intra-ensaio do controle alto 10,02% e do
 164 controle baixo 0,31%.

165



171

172 **Figura 1** – Experimento 1: Representação esquemática dos protocolos hormonais.

173

174 **Experimento 2**

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

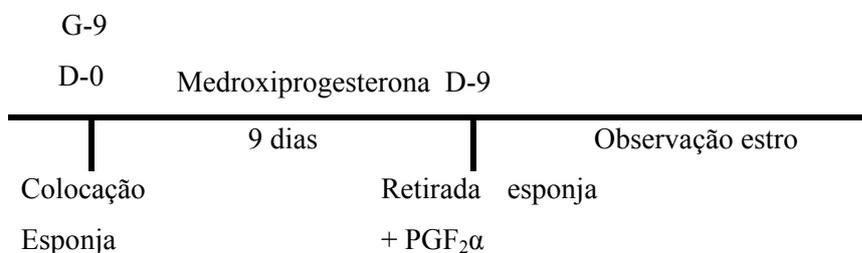
188

189

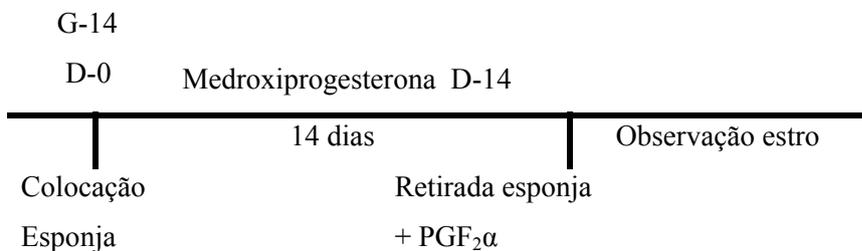
190

191

192



193



194

Figura 2-Experimento 2 : Representação esquemática dos protocolos hormonais.

195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227

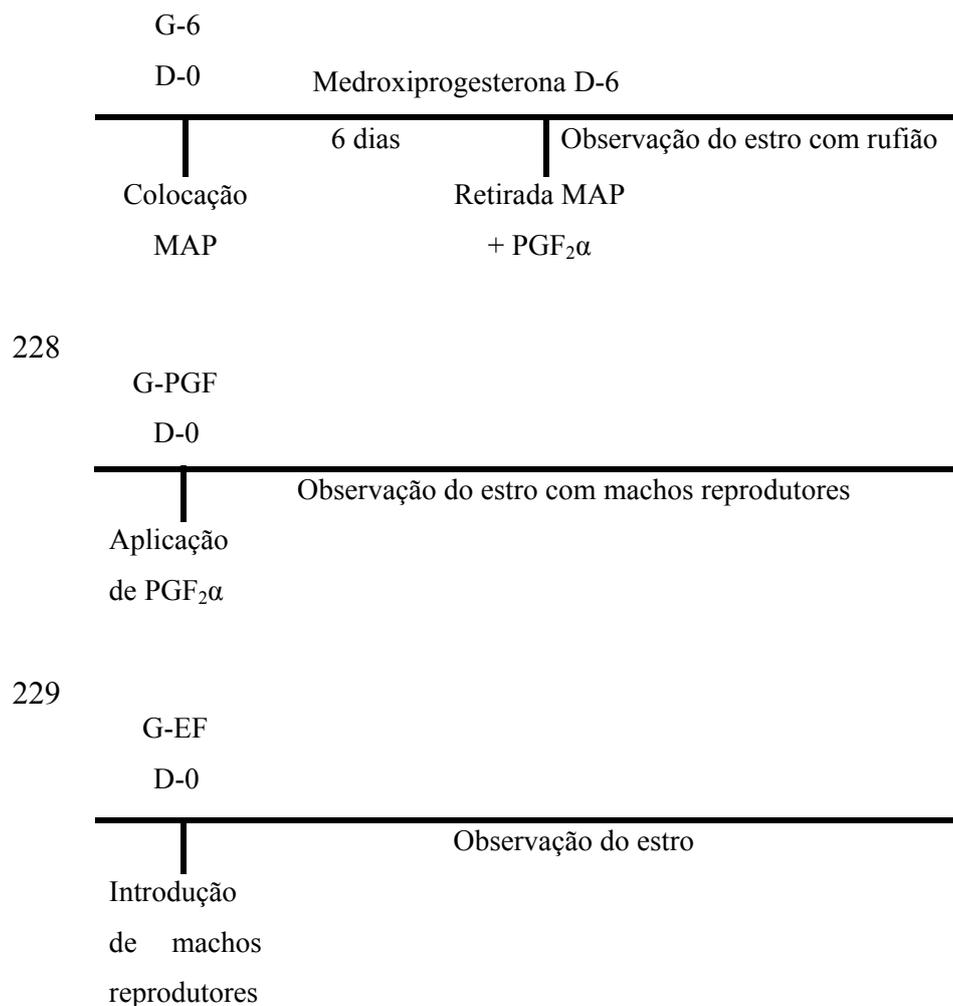
Experimento 3

Na Fazenda 2 foram utilizadas 151 ovelhas da raça Suffolk, durante o mês de Janeiro de 2009, com idade variando de 2 a 4,5, escore corporal 3,0, (escala variando de 1 a 5) mantidas em pastagem de *Brachiaria humidicula* e *Paspalum notatum* (grama Mato Grosso), suplementadas com sal mineral *Ad libitum*. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos (Figura 3): G-6, G-PGF e G-EF (grupo efeito macho).

No grupo G-6 (n=30), em estágio aleatório do ciclo estral, cada ovelha recebeu uma esponja vaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon[®], Schering- Plough, Brasil), as quais foram mantidas por 6 dias. No dia da retirada da esponja (dia 6) foi aplicado 0,0375 mg de D-Cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, Brasil) IM. Vinte e quatro horas após a aplicação de D-Cloprostenol foi realizada observação de estro, 2 vezes ao dia, durante 5 dias, utilizando-se dois machos vasectomizados (rufiões). Nestes machos foi aplicado diariamente, na região do esterno, corante (óleo com tinta tipo Xadrez) para marcar o dorso das fêmeas em estro.

No grupo G-PGF (n=41) em estágio aleatório do ciclo estral cada ovelha recebeu por via IM 0,0375 mg de D-Cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, Brasil). Vinte e quatro horas após a aplicação de D-Cloprostenol foi realizada observação de estro como descrito acima no G-6, mas utilizando-se 6 machos reprodutores avaliados por exame andrológico como aptos para reprodução.

No grupo G-EF (n=80) não foi realizado qualquer tratamento hormonal, apenas o efeito da presença do macho. Foram introduzidos 6 machos reprodutores avaliados por exame andrológico. A observação de estro foi realizada como descrito nos grupos acima (G-6 e G-PGF) por 5 dias. As fêmeas ficaram separadas dos machos, sem contato olfativo ou visual, por um período de pelo menos 2 meses antes da introdução dos reprodutores.



230 **Figura 3** - Experimento 3: Representação esquemática dos protocolos.

231

232 **Análise Estatística**

233

234 No experimento 1, com o objetivo de testar a diferença entre as proporções
 235 amostrais de sucesso de prenhez utilizou-se o teste exato de Fisher. Nos experimentos 2
 236 e 3 com o objetivo de testar a diferença entre as proporções amostrais de ocorrência de
 237 manifestação de cio em ovelhas SRD submetidas aos protocolos G-9, G-14, G-6, G-
 238 PGF e G-EF, utilizou-se o teste exato de Fisher. Para avaliar as diferenças na dispersão
 239 da manifestação de cio entre os grupos da Fazenda 1 (G-9, G-14) e Fazenda 2 (G-6,
 240 G-PGF, G-EF) foi utilizado o teste Qui-quadrado. Para estabelecer comparações entre
 241 todos os grupos de protocolos de experimento, independentemente das fazendas
 242 consideradas, utilizou-se o teste exato de Fisher.

243

244

Para todas as comparações foi considerada a associação significativa quando a estatística calculada foi correspondente a um α inferior a 5% ($p < 0,05$).

245 **RESULTADOS**

246

247

248 **Experimento 1**

249 O presente experimento foi iniciado com 38 animais e 7 saíram, dos quais 3
 250 perderam o CIDR (7,9%), uma veio a óbito no momento da IA e 3 perderam a
 251 numeração resultando em 31 animais ao final do experimento. A tabela 1 demonstra o
 252 número e porcentagem de prenhez nos animais dos grupos G-C (controle), G-eCG e G-
 253 BE. Houve diferença significativa na taxa de prenhez sendo o G-eCG (66,66%)
 254 significativamente maior ($p=0,0244$) que o G-BE (11,11%). Na figura 4 estão
 255 demonstradas as dosagens médias de progesterona obtidas nos dias 0 (D0), dia 6 (G-
 256 eCG e G-BE) ou dia 9 (G-C) correspondendo ao momento de retirada dos implantes,
 257 nos dias 7 (G-eCG e G-BE) ou dia 10 (G-C) 24 horas após a aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ e nos
 258 dias 17 (G-eCG e G-BE) ou dia 20 (G-C), ou seja 9 dias após a IATF. Das 27 amostras
 259 de progesterona do dia 0 apenas 1 animal exibiu concentração abaixo de 1 ng/mL e nas
 260 dosagens realizadas 24 horas após a aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ de 30 amostras apenas 4
 261 exibiram progesterona acima de 2 ng/mL. A progesterona avaliada 9 dias após a IATF
 262 demonstrou que nos grupos G-C e G-eCG todas as amostras exibiram progesterona
 263 acima de 3 ng/mL, ao passo que no grupo G-BE de 9 amostras 4 (44,44%) estavam
 264 abaixo de 2 ng/mL.

265

266 Tabela 1. Porcentagem, número de prenhez e valor de p obtidos da comparação dos
 267 grupos em ovelhas SRD submetidas aos protocolos de sincronização de estro
 268 utilizando-se CIDR por 9 dias (G-C controle, $n=10$) ou por 6 dias (G-eCG,
 269 $n=12$; G-BE, $n=9$) para IATF.

270

Tratamentos	Taxa de Prenhez	Comparações
G-C	30,00% (3/10)ab	vs G-eCG ($p=0,1142$)
G-eCG	66,66% (8 /12)a	vs G-BE ($p=0,0244^*$)
G-BE	11,11% (1/9)b	vs G-C ($p=0,5820$)

271

Letras distintas diferem entre si dentro da coluna ($p<0,05$).

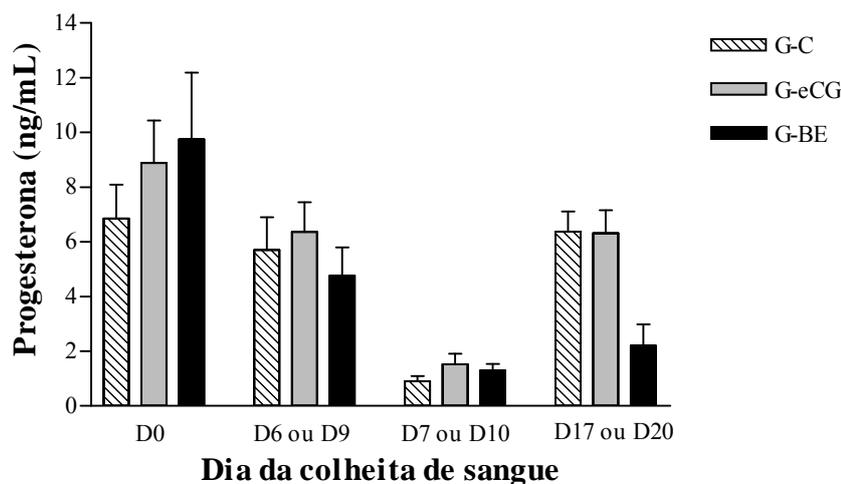
272

p-valor seguidas de * refletem diferenças entre os grupos pelo teste exato de Fisher ao nível de

273

5% de probabilidade.

274



275

276

277 Figura 4: Concentração plasmática (média \pm erro padrão da média) de progesterona em
 278 ovelhas SRD submetidas aos protocolos de sincronização de ovulação
 279 utilizando-se CIDR por 9 dias (G-C controle, n=10) ou por 6 dias (G-eCG,
 280 n=12; G-BE, n=9) para IATF.

281

282

283 Experimento 2

284

285 O presente experimento foi iniciado com 52 animais, no entanto houve perda de
 286 3 esponjas (5,76%) e óbito de 1 fêmea por adesão da esponja seguida de infecção,
 287 resultando em 48 animais. Não houve diferenças significativas quanto aos índices de
 288 estro 69,56 % e 80,00% ($p=0,6168$), taxa de prenhez 34,78% e 44,00% ($p=0,7211$) ou
 289 taxa de concepção 50% e 55% ($p=0,7652$), respectivamente nos grupos de 9 ou 14 dias.
 289 Para efeito de comparação foi realizada análise estatística dentro (protocolos) e entre
 290 fazendas (1 e 2). O número e porcentagem de ocorrência e dispersão de estro nos grupos
 291 9 e 14 dias estão representados nas tabelas 2 e 3. Na tabela 4 estão os valores de p para
 292 as comparações de dispersão e ocorrência de estro pelos testes Qui-quadrado e exato de
 293 Fisher.

294

295

296

297

298 **Tabela 2.** Número, porcentagens de manifestação de estro e valores do p em ovelhas
 299 SRD (G-9 e G-14, fazenda 1) e em ovelhas Suffolk (G-6, G-PGF e G-EF,
 300 fazenda 2) submetidas aos protocolos de sincronização de estro.
 301

Grupos	Ocorrência de Estro	Comparações	
G-9	16/23 (69,6%) a	vs G-14 (p=0,5112)	vs G-6 (p=0,5536)
G-14	20/25 (80,0%) a	vs G-6 (p=0,1318)	vs G-PGF (p=0,0020*)
G-6	15/26 (57,7%) ab	vs G-PGF (p=0,2084)	vs G-EF (p=0,0000*)
G-PGF	16/41 (39,0%) b	vs G-9 (p=0,0360*)	vs G-EF (p=0,0007*)
G-EF	9/80 (11%) c	vs G-9 (p=0,0000*)	vs G-14 (p=0,0000*)

302 Ocorrências seguidas de letras distintas, dentro da coluna, para cada fazenda considerada, diferem entre si
 303 pelo teste exato de Fisher ao nível de 5% de probabilidade. p-valor seguidas de * refletem diferenças
 304 entre os grupos pelo teste Exato de Fisher ao nível de 5% de probabilidade.
 305

307 Experimento 3

308
 309 O presente experimento iniciou com 151 animais, no entanto no grupo G-6 das
 310 30 ovelhas 4 foram excluídas por perda da numeração restando 26 fêmeas. No grupo G-
 311 PGF foram utilizadas 41 ovelhas e o restante, 80 ovelhas, foram utilizadas no grupo G-
 312 EF. Os resultados quanto à ocorrência e dispersão dos estros nos grupos G-6, G-PGF e
 313 G-EF estão representados na tabelas 2 e 3. Não houve diferenças significativas quanto
 314 aos índices de manifestação de estro, 58% e 39%, respectivamente nos grupos G-6 e G-
 315 PGF, no entanto no grupo G-EF a ocorrência de estro foi significativamente menor
 316 (11%). Para a dispersão de estro no grupo G-6 com 46% de ocorrência entre 72 e 120 h
 317 apresentou diferença significativa entre os grupos G-PGF e G-EF de 15% e 11%,
 318 respectivamente para o mesmo período. A dispersão do estro nos grupos G-6 e G-EF
 319 demonstraram diferenças significativas quando comparadas com o grupo G-PGF que se
 320 caracterizou por apresentar índices maiores inicialmente e menores ao final do período
 321 de observação.

322 **Tabela 3.** Número e porcentagens de dispersão de estro por período analisado em ovelhas SRD
 323 (G-9 e G-14) e em ovelhas Suffolk (G-6, G-PGF e G-EF) submetidas aos
 324 protocolos de sincronização de estro nas 2 Fazendas analisadas.
 325

Fazenda	Grupos	Dispersão de Estro por período			Dispersão	Ocorrência
		24-72 h	48-96 h	72-120 h		
1	G-9	61% a (14/23)	65% a (15/23)	35% a (8/23)	A	A
	G-14	80% a (20/25)	64% a (16/25)	24% a (6/25)	A	A
2	G-6	19% ab (5/26)	42% a (11/26)	46% a (12/26)	A	A
	G-PGF	39% a (16/41)	27% a (11/41)	15% b (6/41)	B	A
	G-EF	5% b (4/80)	10% b (8/80)	11% b (9/80)	A	B

326 Letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado, enquanto que maiúscula
 327 nas colunas dispersão e frequência diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e Exato de Fisher,
 328 respectivamente, ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com cada fazenda (1 e 2).

329
 330

331 **Tabela 4.** Determinação das diferenças significativas entre as concentrações de estro de
 332 acordo com os períodos considerados de dispersão de estro em cada período
 333 considerado 24-72h, 48-96h e 72-120h observados entre grupos de ovelhas
 334 SRD.

335

Grupos	Qui-quadrado			Exato de Fisher	
	24-72 h	48-96 h	72-120 h	Dispersão	Ocorrência
G-9 vs G-14	0,2547	0,8306	0,6148	p=0,2687	p=0,5112
G-6 vs G-PGF	0,1522	0,2947	0,0107*	p=0,0031*	p=0,2984
G-6 vs G-EF	0,0634	0,0006*	0,0003*	p=0,3941	p=0,0000*
G-PGF vs G-EF	<0,0001*	0,0320*	0,8078	p=0,0056*	p=0,0007*

336 p-valor seguidas de * refletem diferenças entre os grupos pelos testes Qui-quadrado e Exato de Fisher ao
 337 nível de 5% de probabilidade.

338
 339

340 DISCUSSÃO

341

342 Os experimentos foram realizados nos meses de dezembro e janeiro, portanto
 343 época de transição onde alguns animais começam a sair do anestro estacional. Uma vez
 344 que, as ovelhas apresentam estacionalidade reprodutiva caracterizada por ciclos, que

345 normalmente aparece no verão ou no começo do outono e termina no final do inverno
346 ou no começo da primavera (Ortavant et al., 1985).

347 No experimento 1, após a IATF realizada em torno de 50 h após a retirada do
348 CIDR, resultou em uma taxa de prenhez de 66,6% no grupo G-eCG, sendo esta superior
349 ($p < 0,05$) aos grupos G-C (30%) e G-BE (11,1%). A diminuição no tempo de uso do
350 progestágeno de 9 para 6 dias não afetou os resultados, ao contrário o grupo 6 dias foi
351 numericamente superior ao de 9. Esse resultado é promissor, uma vez que a redução do
352 tempo de permanência do CIDR permite que o mesmo seja re-utilizado, portanto
353 diminuindo o custo do protocolo.

354 Já a aplicação de BE no lugar da eCG foi ineficaz resultando em baixa taxa de
355 prenhez. A escolha dessa droga (benzoato de estradiol) se deve ao baixo custo; e uso
356 rotineiro e com sucesso nos protocolos de IATF em fêmeas bovinas com o intuito de
357 induzir pico pré-ovulatório de LH (Castilho et al., 2000). Em outro estudo com ovelhas
358 o uso de BE 24 horas após a retirada do CIDR, utilizado por 7 dias, apresentou maior
359 taxa de prenhez (75%) em relação ao grupo tratado com eCG (60%), (Borges et al.,
360 2005). Apenas o presente trabalho e o de Borges et al. (2005) foram realizados
361 utilizando o BE, após a retirada do progestágeno, para induzir pico pré-ovulatório de
362 LH e realizar a IATF em ovelhas. O resultado obtido com o BE foi inferior ao trabalho
363 supra citado o qual foi realizado durante a estação reprodutiva e o nosso em Janeiro
364 (fase de transição). No entanto, a dosagem de progesterona no dia 0, em estágio
365 aleatório do ciclo estral, em meados de Janeiro, resultou em 96,3% (1/27) das fêmeas
366 apresentando valores acima de 2 ng/mL, ou seja indicativo de ciclicidade. Outros
367 autores têm evidenciado que raças lanadas e deslanadas criadas no Sudeste possuem
368 comportamento reprodutivo distinto (Traldi, 1990; Roda et al., 1993; Sassa et al.,
369 2002). Segundo esses autores existe um indicativo de que fêmeas lanadas (Romney
370 Marsh e Suffolk) possuem estacionalidade reprodutiva, já as deslanadas (Santa Inês)
371 não. De acordo com nossos dados quase 100% das ovelhas SRD apresentam atividade
372 reprodutiva em Janeiro no Estado de São Paulo.

373 O BE foi prejudicial para a ovulação, uma vez que 44,4% (4/9) das ovelhas
374 desse grupo não ovularam. Este resultado foi confirmado pela dosagem de progesterona
375 realizada 9 dias após a IATF. Já nos outros grupos G-C e G-eCG 100% das ovelhas
376 apresentaram concentração plasmática de progesterona acima de 3 ng/mL no mesmo
377 período. Resultados da dosagem de progesterona realizada 24 horas após a aplicação de
378 $PGF2\alpha$ demonstraram que 86,66% (4/30) das amostras exibiram concentração abaixo

379 de 2 ng/mL. O estro não ocorre, até que os níveis de P4 declinem a cerca de 1ng/mL
380 de plasma (Stabenfeldt et al., 1969; Johnson et al., 1996).

381 O tipo de inseminação influencia a taxa de prenhez, sendo a via intra-uterina a
382 que resulta em melhores taxas, variando de 50 a 85,7% (Milczewski et al., 2000;
383 Rabassa et al., 2007).

384 Nos experimentos 2 e 3 foram testados diferentes protocolos de indução de estro
385 em ovelhas, a fim de determinar qual apresenta a melhor concentração dos estros e
386 servir de base para desenvolver novos protocolos hormonais para IATF. Na fazenda 1
387 utilizamos o progestágeno por longo período de tempo e a ocorrência de estros 69,56 %
388 ou 80,00%, respectivamente nos protocolos de 9 ou 14 dias não foram
389 significativamente diferente. O mesmo foi observado com relação à taxa de prenhez
390 34,78% ou 44,00% ($p=0,7211$) e a taxa de concepção 50% ou 55% ($p=0,7652$)
391 respectivamente nos grupos de 9 ou 14 dias. Também não foi observada diferença
392 significativa quanto à dispersão dos estros entre os dois tratamentos, mas a permanência
393 do progestágeno por tempo maior, ou seja, 14 dias resultou em 80% dos estros até 72 h
394 da retirada do progestágeno ao passo que no grupo de 9 dias 61% das ovelhas entram
395 em cio nesse período, além disso as fêmeas do G-14 manifestaram cio até 84 h após a
396 retirada dos implantes vaginais e no G-9 até 108 h quando 2 fêmeas foram marcada pelo
397 rufião. Em outro estudo, realizado no inverno, utilizando progestágeno (MAP) por 14
398 dias a porcentagem de ocorrência dos estros 92,86% e a taxa de prenhez 50,43% foram
399 um pouco maiores que no nosso trabalho (Simonetti; Gordon; Ramos, 1999). Bicudo et
400 al. (2002) observaram que até 72 h após a remoção da esponja, 88% das ovelhas em
401 estro, porcentagem e dispersão similar ao de nosso estudo com 14 dias usando o
402 progestágeno. Resultados inferiores foram relatados por Husein et al. (1998), que
403 utilizaram esponja vaginal fora da estação reprodutiva por 12 dias e observaram estro
404 em 50% (5/10) das ovelhas que receberam apenas progesterona e a dispersão do estro
405 ocorreu até 60 h após a retirada da esponja. Resultado semelhante, 53,3 a 57,1% de
406 manifestação de estro, foi relatado por Castilho et al. (2007) utilizando meio implante
407 de crestar (progestágeno auricular) por 9 dias acrescido de prostaglandina e eCG (400
408 UI) em ovelhas fora da estação reprodutiva.

409 Embora o tratamento por 14 dias resulte em maior concentração na manifestação
410 do estro, a redução do uso do progestágeno é bem vinda para antecipar a concepção e
411 permitir maior uso dos implantes vaginais.

412 Na fazenda 2 não houve diferenças significativas quanto aos índices de
413 manifestação de estro, 58% e 39%, respectivamente nos grupos G-6 e G-PGF, no
414 entanto no grupo G-EF a ocorrência de estro foi significativamente menor (11%).
415 Semelhante ao nosso resultado (Gastal et al., 2007) utilizando protocolo de 6 dias com
416 CIDR, em janeiro ou seja mesma época que nosso estudo, obtiveram taxa de 56% e
417 usando apenas 1 aplicação de PGF2 α observaram 38,9% das ovelhas em cio até 5 dias
418 após a aplicação. Por outro lado, índice superior foi observado por Bicudo et al. (2002)
419 onde 95% das ovelhas manifestaram estro após retirada do progestágeno mantido por 6
420 dias, provavelmente porque esse estudo foi realizado durante a estação reprodutiva.
421 Podemos observar que a associação do progestágeno com a PGF2 α resulta em maior
422 taxa de estro, em comparação ao uso apenas de luteolítico. Isso é justificado pelo fato da
423 PGF2 α e seus análogos, somente possuem efeito em fêmeas que apresentem corpo
424 lúteo responsivo à sua ação, o que não ocorre normalmente no início da estação
425 reprodutiva, quando nem todas as fêmeas estão no diestro ou ciclando (Uribe-
426 Velásquez, et al, 2002). Esse experimento foi realizado na mesma época do experimento
427 1, mas com grupo genético diferente. Sabe-se que ovelhas sulfolk exibem maior
428 estacionalidade reprodutiva que raças deslanadas como Santa Inês (Sassa et al 2002)

429 A dispersão de estro nos estudos de Bicudo et al (2002) foi maior no protocolo
430 de curta duração 100% até 72 horas após a retirada do progestágeno e 88,5% para o
431 protocolo de longa duração. A dispersão em nosso estudo foi maior no protocolo de
432 longa duração, ou seja, 61% e 80% até 72 h quando comparado com curta duração onde
433 apenas 19% das ovelhas exibiram cio até 72 h após a retirada do progestágeno. Nosso
434 estudo foi realizado em uma época que muitas das fêmeas de raças com estacionalidade
435 reprodutiva bem marcada (ex:Sufffolk) não estão ciclando e isso pode influenciar na
436 concentração da manifestação do cio.

437 Uma alternativa ao uso de hormônios é o efeito macho, ou seja, a introdução de
438 carneiros num lote de ovelhas previamente isoladas dos machos, antes do início do
439 período normal da época reprodutiva (Cushwa et al., 1992). O efeito macho pode ser
440 usado para manipular a reprodução, ao tornar a puberdade mais precoce ou avançar a
441 estação reprodutiva e fornecer algum grau de sincronização do estro na fase tardia do
442 anestro sazonal (Martin et al., 1986). No presente estudo a taxa de ocorrência de cio foi
443 baixa 11% quando comparado aos protocolos hormonais. As fêmeas ficaram isoladas
444 dos machos por pelo menos 2 meses. Martin et al.(1986) demonstrou que o período de

445 duas semanas de separação já é suficiente. Em ovelhas em anestro o efeito macho
446 estimula a ovulação, no entanto, esta primeira ovulação não é acompanhada de
447 manifestação de estro (Ungerfeld et al., 2005). Tem sido relatado cio acompanhando a
448 ovulação quando previamente tratadas com progestágeno antes da introdução do macho
449 (Hunter et al. 1971, apud Ungerfeld et al., 2005). A adoção do efeito macho no manejo
450 reprodutivo justifica-se pela antecipação na ciclicidade, no entanto quando se deseja
451 uma expressiva manifestação de cio é necessário o uso de hormônios.

452

453

454

455 **CONCLUSÕES**

456

457 Concluimos que é possível usar o progestágeno por curto período de tempo (6
458 dias) sem afetar a taxa de prenhez. No entanto o uso de BE resultou em baixa taxa de
459 prenhez.

460 A duração do tratamento com progestágeno por 6, 9 ou 14 dias não afeta a taxa
461 de prenhez e de manifestação de estro em ovelhas. Portanto, é possível diminuir o
462 tempo de permanência do progestágeno.

463 O uso de luteolítico sem o progestágeno resulta em baixa taxa de manifestação
464 de cio.

465

466 **REFERÊNCIAS**

467

468 BICUDO, S. D. **Sistema de acasalamento em ovinos**: monta natural e inseminação
469 artificial. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. FMVZ – UNESP – Botucatu.
470 Disponível em: <www.fmvz.unesp.br/ovinos.htm>. Acesso em: 02 jun. 2004.

471

472 BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B. **Associação de progestágeno, prostaglandina e ecg**
473 **em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas**
474 **suffolk**. Mostra Científica da FMVZ da UNESP, 2002.

475

476 BOLAND, M. P.; CROSBY, F.; O CALLACHAN, D. Artificial control of the breeding
477 season in ewes. **Irish Veterinary Journal**, v.43, p.2-6, 1990.

478

479 BORGES, J. B. S.; OGANDO, P.; SCHLABITZ, P ; BECALUBA, F.; OLIVEIRA, G.
480 H. ; MACHADO, T.M.P. **Inseminação artificial a tempo fixo em ovelhas tratadas**
481 **com CIDR+eCG ou CIDR+Benzoato de estradiol**: Avaliação preliminar. In: 6
482 Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2005, Córdoba. Resúmenes del 6
483 Simposio de Reproducción Animal. Córdoba : Iracbiogen, p. 434-434, 2005.

484

485 CASTILHO, C. et al. Indução do estro em ovelhas da raça texell durante o anestro
486 estacional utilizando meio implante de progestágeno novo ou reutilizado. **Veterinária**
487 **Notícias**, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 39-45, jan./jun. 2007

488

489 CASTILHO, C. et al. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using
490 gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2a and human chorionic
491 gonadotrophin or estradiol benzoate, **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.1, p. 91-101, Jan.
492 2000.

493

494 CUSHWA, W. T et al. Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes:
495 effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. **J.**
496 **Anim. Sci.**, v. 70, p. 1195-1200, 1992.

497

498

499

- 500 GASTAL, G.D.A.; SCHEID FILHO, V.B.; SCHIAVON, R.S.; ULGUIM, R.R.;
- 501 FERNANDES, F.; LUCIA, T. Jr. **Desempenho reprodutivo em ovelhas texel após**
- 502 **sincronização de estro com pessários intravaginais reutilizados.** XVI Congresso de
- 503 Iniciação Científica -Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel , 27,28 e 29 nov de 2007
- 504
- 505 GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 55,
- 506 p. 1187-1194, 1996.
- 507
- 508 GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas**
- 509 **aplicadas à reprodução animal.** São Paulo:Varela, 2001. p.35-41.
- 510
- 511 HUSEIN, M. G. et al. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically
- 512 inseminated with frozen- thawed semen outside breeding season. **Theriogenology**, v.
- 513 49, p. 997-1005, 1998.
- 514
- 515 JOHNSON, S.K.; DAILEY, R.A.; INSKEEP, E.K.; LEWIS, P.E. Effect of peripheral
- 516 concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. **Domestic**
- 517 **Animal Endocrinology**, Auburn, v. 13, n. 1, p. 69-79, 1996.
- 518
- 519 KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a
- 520 laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.95, 1982.
- 521
- 522 KNIGHTS, M. et al. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for
- 523 inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewe. **Anim.**
- 524 **Reprod. Sci.**, v.79, p. 1120-1131, 2001.
- 525
- 526 MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução
- 527 e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.36,
- 528 n.1, p.171-178, 2001.
- 529
- 530 MARTIN, G.B. et al. The physiological response of anovulatory ewes to the
- 531 introduction of rams- a review. **Livest. Prod. Sci.**, v. 15, p. 219-247, 1986.
- 532

- 533 MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Inseminação artificial intrauterina e
534 cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science** v.5,
535 p.35-39, 2000.
- 536
- 537 ORTAVANT , R .; PERLLETIER, J.;RAVAULT, J.P.; THIMONIER, J.;
538 OLLANDNAIL, P. Photoperiod, main proximal and distal factor of distal factor of the
539 circannual cycle of reproduction in animal. **Oxford Rver Reprod. Biol.**, p. 562-571,
540 1985.
- 541
- 542 RABASSA, V. R ; TABELEÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER,A.;
543 ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N.C.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA,
544 M.N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de
545 ovelhas inseminadas em tempo-fixo **Ciência Animal Brasileira** , v. 8, n. 1, p. 127-133,
546 jan./mar. 2007
- 547
- 548 RODA, D.S.; SANTOS, L.E.; CUNHA, E.A. et al. Desempenho de ovinos em sistema
549 de acasalamento a cada oito meses. **Boletim da Indústria Animal**, v.50, n.01, p.49-54,
550 1993.
- 551 SASA, A; TESTON, D.C.; RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; SCHALCH, E.
552 Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no
553 Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de**
554 **Zootecnia**, v.31, 1150-1156, 2002.
- 555 SIMONETTI, L.; GARDÓN, J. C.; RAMOS, G. Residual levels on medroxyprogesterone
556 acetate (MAP) impregnated sponges after estrus synchronization treatment in cyclic ewes
557 **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** vol.36, n.5 São Paulo 1999
- 558
- 559 STABENFELDT, G.H.; HOLT, J.A.; EWING, L.L. Peripheral plasma progesterone
560 levels during the ovine estrous cycle. **Endocrinology**, Bethesda, v. 85, n. 1, p. 11-15,
561 1969.

- 562 TRALDI, A.S. Produção de ovinos. Aspectos reprodutivos dos ovinos. **Performance**
563 **reprodutiva dos ovinos deslanados no Brasil**. Jaboticabal: Fundação Universidade
564 Estadual Paulista, 1990. p.81-124.
- 565 UNGERFELD., R. et al. Endocrine and Ovarian Changes in Response to the Ram
566 Effect in Medroxyprogesterone Acetate-primed Corriedale Ewes During the Breeding
567 and Nonbreeding Season. **Acta vet. scand.** v. 46, p. 33-44, 2005.
- 568
- 569 URIBE-VELÁSQUEZ, L. F. et al. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o
570 folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou
571 PGF2a. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 944-953, 2002.
- 572
- 573 VIÑOLES, C. et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on
574 follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.55, p.
575 993-1004, 2001.