

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA**

**CLÁUDIO FRANCISCO BROGNI**

**DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS, MANIPULAÇÃO DO CICLO  
ESTRAL E SUAS RESPOSTAS**

**LAGES, SC**

**2022**

**DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS, MANIPULAÇÃO DO CICLO  
ESTRAL E SUAS RESPOSTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Alceu Mezzalira

**LAGES, SC**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

BROGNI, CLÁUDIO FRANCISCO  
DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS,  
MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL E SUAS RESPOSTAS /  
CLÁUDIO FRANCISCO BROGNI. -- 2022.  
60 p.

Orientador: ALCEU MEZZALIRA  
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal, Lages, 2022.

1. Estro. 2. Desenvolvimento folicular. 3. Ultrassonografia,. 4.  
Estação Reprodutiva. 5. Implantes de progesterona. I.  
MEZZALIRA, ALCEU. II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.


CLÁUDIO FRANCISO BROGNI

**DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS, MANIPULAÇÃO DO CICLO  
ESTRAL E SUAS RESPOSTAS**

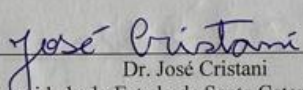
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal  
área de concentração: Reprodução Animal.

Banca Examinadora

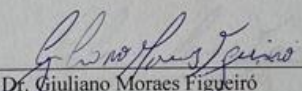
Orientador:

  
Dr. Alceu Mezzalana  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

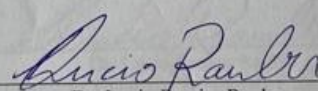
Membro interno:

  
Dr. José Cristani  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC


Membro externo:

  
Dr. Giuliano Moraes Figueiró  
Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Curitibanos

Membro externo:

  
Dr. Lucio Pereira Rauber  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense - Campus Concórdia

Membro externo:

  
Dra. Deise Keli Farias  
Médica Veterinária autônoma

Lages, SC, 19/07/2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me acompanhou em todos os momentos de minha vida, me guiando para o melhor, mesmo que para isso tivesse que passar por caminhos difíceis. Aos meus pais Adilson e Carmelina, que incessantemente me apoiaram desde o início da minha trajetória.

Ao professor orientador e amigo Alceu Mezzalira, que não mediu esforços para auxiliar em toda minha caminhada dentro e fora da faculdade. Obrigado pelos elogios e puxões de orelha que me serviram para melhorar como pessoa e como profissional. Agradeço pela confiança depositada em mim para que eu pudesse desenvolver trabalhos de pesquisa dentro do Laboratório de Reprodução Animal durante toda a faculdade fazendo com que isso abrisse horizontes e despertasse minha vontade e interesse pela pesquisa, desta forma iniciando no mestrado e agora no doutorado, agradeço de coração.

Um agradecimento especial os Professores que foram verdadeiros Mestres do conhecimento, transferindo seus ensinamentos e experiências que com certeza foram fundamentais para meu aprendizado. Não poderia deixar de mencionar minha companheira de quase 14 anos Elaine que sempre esteve ao meu lado apoiando e me incentivando para que pudesse evoluir como pessoa e como profissional. E a tantas pessoas anônimas que de alguma maneira contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigado a todos!

Dedico a Deus, à minha família, à família do Laboratório de Reprodução Animal-CAV, a minha companheira e a todas as pessoas que contribuíram para que esse degrau fosse alcançado.

## RESUMO

BROGNI, CLÁUDIO FRANCISCO. DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS, MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL E SUAS RESPOSTAS. 2022. 60 f. Tese em Ciência Animal - Área de concentração: Reprodução Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, SC 2022.

Ovelhas leiteiras apresentam diferentes características reprodutivas, de acordo com a sazonalidade e a dinâmica ovariana desses animais é pouco conhecida. Desta forma é necessário o conhecimento e o entendimento da dinâmica folicular ovariana destas ovelhas. Este projeto teve por objetivos avaliar a dinâmica folicular de ovelhas leiteiras, dentro e fora da estação reprodutiva, bem como o efeito do emprego de duas concentrações de progesterona (60 e 120mg) nos pessários vaginais. No primeiro experimento, quarenta fêmeas foram divididas em dois grupos de vinte animais. Um grupo foi avaliado durante a estação reprodutiva e o outro avaliado fora da estação reprodutiva. Em cada período, dez animais foram pré-sincronizados com 60mg de progesterona, e outros dez com 120mg de progesterona. As fêmeas foram diariamente submetidas a exame ultrassonográfico para mapear o desenvolvimento folicular. No segundo experimento, quarenta fêmeas foram utilizadas e distribuídas da mesma forma do experimento 1, e as avaliações ocorreram durante a permanência do dispositivo de progesterona. No terceiro experimento foram utilizadas fêmeas em idade reprodutiva sendo 35 dentro da estação reprodutiva e 34 fora da estação reprodutiva. Nesta fase foram avaliadas a taxa de concepção, o tamanho do corpo lúteo aos 30 dias de gestação e o número de cordeiros nascidos por ovelha. Os dados qualitativos foram submetidos ao teste Qui quadrado e os demais dados submetidos à análise de variância do pacote estatístico SAS® à significância de 5%. O momento avaliado (dentro e fora da estação reprodutiva), bem como a concentração de progesterona empregada nos pessários vaginais influenciaram a dinâmica folicular. O experimento 1 demonstrou que na estação reprodutiva, o número de ovulações (1,35 vs 1,05), o diâmetro do folículo ovulatório (5,97 vs 5,05), a fase lútea (11 vs 9,14 dias) e a duração do ciclo estral (16,83 vs 16,6 dias) foram maiores em relação a fora da estação, respectivamente. Fora da estação, as ovelhas não apresentaram corpo lúteo, caracterizando o anestro sazonal. O experimento 2 demonstrou uma precoce regressão (3,11 dias) do folículo dominante com 120mg de progesterona, na estação reprodutiva. Já com 60mg de progesterona, mesmo na estação reprodutiva, a regressão ocorreu aos 4,40 dias. O período de ovulação, após a remoção do pessário, ocorreu aproximadamente às 48 horas na estação e às 53 horas, fora da estação. No

experimento 3, maior taxa de concepção 71,4% (25/35) foi obtida na estação reprodutiva em relação a fora da estação 50% (17/34). Pessários com 120mg de progesterona aumentaram a taxa de concepção fora da estação reprodutiva 58,8% (10/17) em relação com 41,2% (7/17) com 60 mg. Houve maior número de cordeiros nascidos por fêmea na estação (2,32-58/35) em relação a fora da estação (1,59-27/17). O CL gestacional aos 30 dias foi maior na estação. Os dados permitem concluir que a dinâmica folicular da ovelha leiteira, dentro da estação, tem comportamento diferente de fora da estação, e que o aumento na concentração de progesterona no dispositivo vaginal pode viabilizar os protocolos de inseminação/cobertura em tempo fixo durante o período de anestro sazonal, otimizando a reprodução de ovelhas leiteiras.

Palavras-chave: Estro, Desenvolvimento folicular, Ultrassonografia, Estação Reprodutiva, Implantes de progesterona.



## ABSTRACT

BROGNI, CLAUDIO FRANCISCO. FOLLICULAR DYNAMICS IN DAIRY EWES, MANIPULATION OF THE ESTRAL CYCLE AND THEIR RESPONSES. 2022. 60 f. Thesis in Animal Science - Area of concentration: Animal Reproduction - Santa Catarina State University. Animal Science Postgraduate Program, Lages, SC 2022.

Dairy sheep have different reproductive characteristics, according to seasonality and the ovarian dynamics of these animals is poorly understood. Thus, it is necessary to know and understand the ovarian follicular dynamics of these sheep. This project aimed to evaluate the follicular dynamics of dairy ewes, inside and outside the breeding season, as well as the effect of the use of two concentrations of progesterone (60 and 120mg) in vaginal pessaries. In the first experiment, forty females were divided into two groups of twenty animals. One group was evaluated during the breeding season and the other was evaluated outside the breeding season. In each period, ten animals were pre-synchronized with 60mg of progesterone, and another ten with 120mg of progesterone. Females were daily submitted to ultrasound examination to map follicular development. In the second experiment, forty females were used and distributed in the same way as in experiment 1, and the evaluations took place during the permanence of the progesterone device. In the third experiment, females of reproductive age were used, 35 within the breeding season and 34 outside the breeding season. In this phase, the conception rate, the size of the corpus luteum at 30 days of gestation and the number of lambs born per ewe were evaluated. Qualitative data were submitted to the Chi-square test and the other data were submitted to analysis of variance of the SAS® statistical package at a significance level of 5%. The time evaluated (inside and outside the breeding season), as well as the concentration of progesterone used in the vaginal pessaries, influenced the follicular dynamics. Experiment 1 showed that in the breeding season, the number of ovulations (1.35 vs 1.05), the diameter of the ovulatory follicle (5.97 vs 5.05), the luteal phase (11 vs 9.14 days) and the duration of the estrous cycle (16.83 vs 16.6 days) were longer compared to the off-season, respectively. Out of season, ewes did not present a corpus luteum, characterizing seasonal anestrus. Experiment 2 demonstrated an early regression (3.11 days) of the dominant follicle with 120mg of progesterone, in the breeding season. With 60mg of progesterone, even in the breeding season, regression occurred at 4.40 days. The period of ovulation, after the removal of the pessary, occurred at approximately 48 hours in the season and at 53 hours outside the season. In experiment 3, a higher conception rate 71.4% (25/35) was obtained in the breeding season

compared to the off-season 50% (17/34). Pessaries with 120mg of progesterone increased the conception rate outside the breeding season by 58.8% (10/17) compared to 41.2% (7/17) with 60mg. There was a greater number of lambs born per female in season (2.32-58/35) compared to out of season (1.59-27/17). Gestational CL at 30 days was higher in the season. The data allow us to conclude that the follicular dynamics of the dairy ewe, inside the season, has a different behavior from outside the season, and that the increase in the concentration of progesterone in the vaginal device can make viable the insemination/covering protocols at a fixed time during the period of seasonal anestrus, optimizing the reproduction of dairy sheep.

Keywords: Estrous cycle, Follicular development, Ultrasonography, Reproductive season, Progesterone implants.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Valores médios  $\pm$  D.P. para número de ondas foliculares por ciclo estral, taxa de ovulação, diâmetro do folículo ovulatório, duração da fase lútea em dias, duração da fase folicular em dias e duração do ciclo estral em dias, de acordo com a época do ano (dentro e fora da estação) e com duas concentrações de progesterona (60 e 120mg), em ovelhas leiteiras. Ciclo completo após a retirada do implante.....38
- Tabela 2 Valores médios  $\pm$  D.P. para tamanho máximo do corpo lúteo(mm), ovulação em dias após a observação da emergência do folículo ovulatório, dia da observação do CL, último dia da observação do CL e dia do máximo diâmetro do CL, em função da dose de progesterona (60 e 120mg) e épocas do ano (dentro e fora da estação), em ovelhas leiteiras. Ciclo completo após a retirada do implante.....39
- Tabela 3 Valores médios  $\pm$ D.P. para dia da emergência do folículo de maior diâmetro, maior diâmetro(mm), do folículo dominante (FD), dia do diâmetro máximo do FD, fase estática em dias do FD, fase de crescimento em dias do FD, fase de regressão do FD em dias, taxa de crescimento mm/dia do FD, taxa de regressão mm/dia do FD e intervalo entre ondas, para cada onda do desenvolvimento folicular, dentro e fora da estação reprodutiva, em ovelhas leiteiras. Ciclo completo após a retirada do implante..... 40
- Tabela 4 Valores médios  $\pm$  D.P. diâmetro do FD no D0, atresia completa do FD em dias, taxa de regressão em mm/dia do FD, dia de emergência de um novo FD, diâmetro do FO, número de ovulações, e horas para ovulação após a retirada dos implantes de acordo com os grupos (60 e 120mg) e épocas do ano (dentro e fora da estação), em ovelhas leiteiras. Ciclo durante a permanência do implante.....53
- Tabela 5 Taxa de concepção de ovelhas adultas, utilizando protocolo curto de 6 dias com 60 e 120mg de progesterona dentro e fora da estação reprodutiva, em relação a taxa de concepção, tamanho do CL e ao número de cordeiros nascidos/fêmea.....54

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ultrassonografia em estação. Fonte: Próprio autor.....24
- Figura 2- Estruturas ovarianas, folículo dominante e corpo lúteo. Fonte: Próprio autor.24

## LISTA DE ABREVIATURAS

CL – Corpo Lúteo

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

LH – Hormônio Luteinizante

PMSG – Gonadotrofina Coriônica da Égua prenhe

FD – Folículo Dominante

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 Alfa

FO – Folículo Ovulatório

D0 – Dia zero

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

P4 – Progesterona

D.P – Desvio Padrão

US – Ultrassonografia

PV – Peso vivo

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3</b>     | <b>HIPÓTESES.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>4</b>     | <b>OBJETIVOS GERAIS.....</b>   | <b>22</b> |
| 4.1          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 22        |
| <b>5</b>     | <b>METODOLOGIA.....</b>  | <b>22</b> |
| 5.1          | SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....   | 22        |
| 5.2          | AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA.....   | 23        |
| 5.3          | EXPERIMENTO 1 – DINÂMICA FOLICULAR DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO..  | 26        |
| 5.4          | EXPERIMENTO 2 – MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....   | 26        |
| 5.5          | EXPERIMENTOS 3 – TAXA DE CONCEPÇÃO.....  | 27        |
| 5.6          | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....   | 27        |
|              | <b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>6</b>     | <b>ARTIGO 1 – DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS<br/>DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA, EMPREGANDO ALTA<br/>OU BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA NA<br/>SINCRONIZAÇÃO .....</b> | <b>32</b> |
| 6.1          | RESUMO.....  | 32        |
| 6.2          | INTRODUÇÃO.....  | 33        |
| 6.3          | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 34        |
| <b>6.3.1</b> | <b>Seleção dos animais.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>6.3.2</b> | <b>Avaliação ultrassonográfica.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>6.3.3</b> | <b>Análise Estatística dos Dados.....</b>  | <b>35</b> |
| 6.4          | RESULTADOS.....  | 35        |
| 6.5          | DISCUSSÃO.....   | 41        |
| 6.6          | CONCLUSÃO.....   | 43        |
|              | REFERÊNCIAS.....   | 45        |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>7</b>     | <b>ARTIGO 2 – A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA E A ESTAÇÃO REPRODUTIVA INTERFEREM NA DINÂMICA FOLICULAR E NA FERTILIDADE DE OVELHAS LEITEIRAS.....</b> | <b>47</b> |
| 7.1          | RESUMO .....   | 47        |
| 7.2          | INTRODUÇÃO.....  | 48        |
| 7.3          | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 49        |
| <b>7.3.1</b> | <b>Seleção dos animais.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>7.3.2</b> | <b>Avaliação ultrassonográfica.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>7.3.3</b> | <b>Manipulação do ciclo estral.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>7.3.4</b> | <b>Taxa de Concepção.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>7.3.5</b> | <b>Análise Estatística dos Dados.....</b>  | <b>50</b> |
| 7.4          | RESULTADOS .....   | 51        |
| 7.5          | DISCUSSÃO.....   | 55        |
| 7.6          | CONCLUSÃO.....   | 56        |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>8</b>     | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>60</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A sazonalidade na reprodução é um processo fisiológico adaptativo dos animais para proporcionar nascimentos em épocas com oferta de alimento e condições adequadas de clima, aumentando assim a possibilidade de sobrevivência dos filhotes (VALENTIM et al., 2006). Com a domesticação, muitas espécies, como os bovinos e suínos, perderam esta capacidade adaptativa. Todavia, em ovinos, especialmente aqueles originários de maiores latitudes, esta característica permaneceu. Em função da duração da gestação, a sazonalidade reprodutiva dos ovinos foi adaptada para que a atividade sexual tenha início com a redução da luminosidade (FONSECA, 2006), permitindo o nascimento dos cordeiros em um período primaveril, com condições mais favoráveis para sua sobrevivência. A sazonalidade reprodutiva das ovelhas é regida pela melatonina, que é produzida e liberada no período noturno, possibilitando que o animal consiga determinar a duração do período de luz, a cada dia (SRINIVASAN et al., 2009). No entanto, a adaptação evolutiva possibilitou uma significativa variação na estacionalidade reprodutiva da espécie ovina, em função da raça e das características produtivas dos animais. Em ovelhas com aptidão para produção de lã, esta sazonalidade é bem marcada, enquanto nas raças com aptidão para carne, a sazonalidade é menos acentuada. Já nas raças deslanadas, praticamente não ocorre a sazonalidade reprodutiva. Embora seja bem conhecido o comportamento reprodutivo de ovelhas especializadas na produção de lã, de carne e mesmo das ovelhas deslanadas, são escassas as informações a respeito do comportamento reprodutivo de ovelhas de raças leiteiras. Considerando que a produção de leite ovino é um mercado atrativo, porém que exige uma constante e homogênea produção de leite ao longo do ano, existe a necessidade do entendimento do comportamento reprodutivo destes animais, principalmente pelo conhecimento da sua dinâmica de crescimento folicular dentro e fora da estação reprodutiva.

No Sul do Brasil, especialmente em Santa Catarina, a ovinocultura leiteira tem experimentado um acentuado crescimento. Em função disso, tem aumentado a demanda por tecnologias que possibilitem o acasalamento ao longo de todo o ano, para manter constante a produção de leite e melhorar as taxas de prenhez dos rebanhos.

O conhecimento da dinâmica folicular em ovelhas leiteiras poderá permitir o uso de protocolos hormonais que possibilitem a otimização dos parâmetros, buscando a sincronização deaios e adequadas taxas de gestação, independente da estação reprodutiva, possibilitando assim uma distribuição homogênea de partos ao longo do ano e por consequência, uma homogênea produção de leite ao longo do tempo, aumentando a viabilidade do negócio.



Desta forma, este estudo buscou conhecer a dinâmica folicular em ovelhas leiteiras, dentro e fora da estação reprodutiva, utilizando baixa (60mg) ou alta (120mg) concentração de progesterona na sincronização dos cios, bem como sua influência na fertilidade.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A ovinocultura vive uma estagnação econômica, em função de não ter uma escala de produção competitiva que mantenha constante e padronizado o fornecimento de carne e principalmente de leite. Desta forma, é necessário buscar alternativas que permitam que os animais possam produzir o ano todo, dando importância para a atividade no cenário catarinense. O processo adaptativo da reprodução dos mamíferos selvagens e domésticos é caracterizado por períodos alternados de inatividade e ciclicidade reprodutiva. Essa condição está correlacionada às mudanças nas estações do ano, gestação, lactação e no início da puberdade dos animais (VALENTIM et al., 2006). Essencialmente, esse mecanismo procura ajustar os momentos em que as necessidades energéticas dos animais são maiores (fase final do desenvolvimento fetal, fase inicial da lactação e desenvolvimento da cria) ao período do ano em que as condições climáticas e a disponibilidade de alimentos são mais favoráveis. Entretanto, essa estacionalidade reprodutiva acaba por concentrar os partos num período curto, conferindo assim, vantagem na luta pela preservação das espécies, principalmente das que são alvo de predação, como é o caso da espécie ovina (VALENTIM et al., 2006). Os ovinos são considerados poliéstricos sazonais de dias curtos, ou seja, apresentam um padrão sazonal de reprodução, em época do ano no qual o número de horas-luz do dia é menor (ZIEBA et al., 2011), permanecendo em anestro no restante do período. Este efeito é definido primeiramente pela latitude e em segundo lugar pela raça (FONSECA, 2006). O local de criação desses animais, no que diz respeito a disposição geográfica e de latitude, influenciam diretamente a atividade reprodutiva da espécie. Ovinos originários de regiões temperadas ou frias, tem uma marcante sazonalidade (VALENTIM et al., 2006), com diminuição da atividade reprodutiva no período do outono e do inverno, períodos de menor incidência luminosa (AZEVEDO et al., 2008). Já os animais originários ou localizados em regiões próximas da linha do equador, a estacionalidade reprodutiva não é tão marcante, principalmente em animais deslanados (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A duração da estação reprodutiva é inversa à latitude, sendo maior quando a latitude é menor (LEBOEUF et al., 2000), desta forma, maiores latitudes causam marcada estacionalidade em pequenos ruminantes. No hemisfério Sul, independente da especialização de produção ou raça, a estacionalidade reprodutiva dos ovinos ocorre entre os

meses de março a maio, ou mais especificamente, no outono (BICUDO et al., 2005). Entretanto, não somente a baixa luminosidade faz com que se tenha estacionalidade na atividade reprodutiva das fêmeas ovinas, mas também a falta de alimentos e temperaturas altas restringem a atividade sexual, podendo afetar a atividade reprodutiva durante alguns meses do ano (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O fotoperíodo afeta diretamente a atividade reprodutiva dos ovinos, através do sistema neuroendócrino, e indiretamente através da disponibilidade de alimentos (VALENTIM et al., 2006). A glândula pineal que produz o hormônio melatonina (MACCHI & BRUCE, 2004), que é secretado de forma rítmica durante a noite (THIÉRY et al., 2002; HAFEZ & HAFEZ, 2004) é produzido em maior concentração nos períodos de menor duração da luz do dia (AZEVEDO et al., 2008), sendo a responsável pela estação de monta nos ovinos. A retina que capta a luz, transmite por via nervosa até a glândula pineal, estimulando a secreção de melatonina. Este hormônio é produzido seguindo um ritmo endógeno, sincronizado pelo fotoperíodo e pela ação diária da luz (VALENTIM et al., 2006). Quando os dias começam a ter menos horas de luz, a exposição dos animais à melatonina aumenta, sinalizando a estação do ano e o começo das descargas hormonais (SRINIVASAN et al., 2009). Embora a melatonina atue em vários níveis do eixo reprodutivo, sua ação principal ocorre no sistema nervoso central, relacionado a modificações da frequência de liberação de GnRH e LH (VALENTIM et al., 2006). Assim, estes acabam manifestando atividade reprodutiva, apenas na época do ano em que o número de horas luz dos dias estão diminuídas (OLIVEIRA, 2012). Durante a estação reprodutiva dos ovinos, a redução da luminosidade diária estimula uma maior produção e secreção de melatonina pela glândula pineal, elevando a produção de gonadotrofinas pela hipófise. A utilização de melatonina exógena, através de implantes, comprovam que em animais no anestro podem induzir atividade reprodutiva (VALENTIM et al., 2006).

Além desta sazonalidade reprodutiva bem marcante, podemos encontrar outros problemas relacionados as biotécnicas utilizadas no manejo reprodutivo das ovelhas, como por exemplo, os distintos resultados alcançados com as diversas formas de inseminação. Nas ovelhas é possível realizar inseminação das seguintes maneiras: através do método vaginal, intracervical, transcervical e por laparoscopia. As duas primeiras só apresentam taxas de prenhez aceitáveis com o emprego de sêmen à fresco ou refrigerado (CSEH et al., 2012), devido à dificuldade de migração espermática causada por alterações decorrentes da criopreservação, associado a condição anatômica da cérvix ovina. O local da inseminação tem um efeito importante sobre a prenhez, com maiores taxas obtidas com a inseminação por laparoscopia ou transcervical (WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004). A única metodologia aplicada com sêmen congelado em grande escala é por laparoscopia, porém ainda é cara e necessita de mão

de obra mais tecnicizada (HALBERT et al., 1990). A coleta e transferência de embriões, pode ser feita pela via transcervical, porém isso não acontece em escala comercial devido à limitação anatômica da cérvix (FONSECA et al., 2013; FONSECA et al., 2016). A técnica transcervical é limitada devido à disposição dos anéis cervicais, o qual geralmente impossibilita a passagem do aplicador de sêmen até chegar no corpo do útero na inseminação artificial (EVANS et al., 1987), limitando a difusão da técnica de IA e também na inovulação de embriões (AUDICANA et al., 1998).

Em condições naturais, ovelhas leiteiras apresentam sazonalidade reprodutiva, determinando que a produção de leite fique concentrada em época reduzida do ano. Associado a essa sazonalidade, ainda é observada uma grande variação na janela de ovulação (CUMMING et al., 1971), principalmente quando se usa apenas análogos da  $PGF2\alpha$  como indutores de estro (VILARIÑO et al., 2017), dificultando o ajuste do melhor momento da inseminação e/ou cobertura. O uso de um protocolo de sincronização que possibilite concentrar o momento da ovulação em ovelhas, permitindo assim que o encontro de gametas ocorra no momento mais adequado, é sem dúvida uma ferramenta muito importante. A sincronização de cio e de ovulação mais utilizada em ovelhas tem por base o uso progestágeno intravaginal por um período de 12-14 dias, seguida de administração de eCG, no momento da retirada do implante (MARTEMUCCI & ALESSANDRO, 2010). No início do uso desses protocolos o uso da gonadotrofina foi ajustado por BOLAND et al. (1981) de 250 a 750 UI conforme época do ano, raça do animal e a idade. Este protocolo se tornou muito utilizado antes dos anos 90, quando não se tinha conhecimento sobre a dinâmica folicular em (MENCHACA & RUBIANES, 2004). A partir dos primeiros estudos, de dinâmica folicular foi possível ajustar as doses e o período de permanência do dispositivo intravaginal, e nos dias atuais o protocolo padrão usado é aquele com seis dias de permanência do dispositivo, reduzindo o aparecimento de vaginites e otimizando o manejo de coberturas dentro da propriedade.

A função folicular tem sido estudada em ovinos, embora a descrição dos padrões de desenvolvimento folicular nessa espécie tenha apresentado controvérsias nos primeiros estudos. Alguns autores descreveram o crescimento folicular como contínuo e independente do estágio do ciclo estral (HUTCHINSON E ROBERTSON, 1966; SCHRICK et al., 1993; LOPEZ-SEBASTIAN et al., 1997), já outros estudos demonstraram um padrão de ondas (NOËEL et al., 1993; RAVINDRA et al., 1994; GINTHER et al., 1995; BARTLEWSKI et al., 1998). Atualmente, existe um consenso geral que une os dois pontos de vista, que se baseia na alta variabilidade no número de folículos que se desenvolvem em cada onda e no grande número de ondas em cada ciclo estral (EVANS, 2003). Dessa forma, folículos  $\geq 5$  mm de diâmetro exibem

um padrão de crescimento semelhante, enquanto folículos menores que 4mm crescem aleatoriamente dentro de cada onda (GINTHER et al., 1995; SOUZA et al., 1996).

Com o domínio da técnica de avaliação da dinâmica folicular em ovinos (GINTHER et al., 1995; BARTLEWSKI et al., 1998), através do mapeamento ovariano por ultrassonografia, foi possível a obtenção de conhecimentos mais concretos sobre o funcionamento da dinâmica ovariana, em cada situação (MENCHACA & RUBIANES, 2004). Com a avaliação folicular foi possível demonstrar que após o tratamento com PGF2 $\alpha$ , ocorre uma dispersão no estro e na ovulação, demonstrando que o uso isolado de PGF2 $\alpha$  não é eficaz para controlar o desenvolvimento folicular (VINOLES & RUBIANES, 1998; BARRETT et al., 2004; RUBIANES & MENCHACA, 2003a, 2003b). Com o uso da ultrassonografia, foi demonstrado que em ovelhas a emergência da onda folicular ocorre aproximadamente a cada 5 dias (EVANS, 2003) e que o corpo lúteo já é sensível à PGF2 $\alpha$  aos três dias após a ovulação (RUBIANES E MENCHACA, 2003a; 2003b).

A ultrassonografia possibilitou também o acompanhamento do momento da emergência da onda, o crescimento folicular e a ovulação (BROGNI & SOUZA, 2021), contrastando com os trabalhos anteriores, que realizavam avaliações de ovário empregando a laparoscopia ou laparotomia, em momentos pontuais (BOSCOS et al., 2002; BRAND & JONG, 1973; DRIANCOURT et al., 1985; NOEL et al., 1993). Além disso, outras técnicas podem ser associadas para melhor entendimento do que é observado na ultrassonografia, demonstrando se um cisto ovariano é funcional ou afuncional, se o folículo está liberando ou não estrógeno, ou até mesmo a real concentração hormonal plasmática, após a aplicação de hormônios exógenos (WU et al., 2009).

A dominância folicular em ovelhas é diferenciada, apresentando padrões de crescimentos variados. Folículos menores que 4mm, crescem de forma aleatória, podendo aparecer em número variado e de várias maneiras durante as ondas de crescimento folicular em um ciclo estral. Já folículos maiores do que 5mm tem padrões de crescimento modulado, ou seja, aparecem menos dispersos durante um ciclo estral e de forma mais concentrada (GONZALEZ-BULNES & VEIGA-LOPEZ, 2005). Os folículos pré-ovulatórios de cada onda secretam elevada quantidade de inibina A e estradiol, causando a redução da concentração de FSH e a atresia de folículos menores (BAIRD, 1983). O mecanismo de dominância folicular em ovinos e caprinos é diferente daquele observado em vacas (GINTHER et al., 1989; MIURA, 2019), nas quais se tem o conhecimento que o folículo dominante inibe o crescimento de outros folículos no ovário (FORTUNE, 1994). Na ovelha, o folículo dominante evita sua própria regressão, ao mudar sua dependência de FSH para LH (CAMPBELL et al., 1995). O folículo pré-

ovulatório inibe o crescimento de outros folículos presentes nos ovários no momento da emergência. Entretanto, o surgimento de novos folículos é seja reduzido porem não é inibido, embora seu crescimento subsequente seja suprimido (GONZALEZ-BULNES et al., 2001; 2004). Na fase lútea do crescimento folicular, padrões diferentes são encontrados nos ovários de ovelhas. Quando as concentrações de LH permanecem baixas, os folículos tornam-se criticamente dependente do FSH, sem que seja estabelecida uma dominância. Esta diminuição de LH, explica os efeitos supressores da progesterona do corpo lúteo nos folículos dominantes em ovelhas (ADAMS, 1999). Há uma falta de dominância durante a fase lútea do ciclo estral ovino até a luteólise, quando a secreção de LH aumenta por um incremento na secreção de estradiol pelos folículos pré-ovulatórios (BAIRD, 1983), determinando que a dominância se torne evidente (LOPEZ-SEBASTIAN et al., 1999). Baixos níveis de progesterona sérica aumentam a frequência de pulsos de LH, que por sua vez aumenta o tamanho do folículo maior e realiza o feedback positivo do estradiol com o eixo GnRH e LH. Já concentrações sub-luteais de progesterona aumentam os pulsos de LH, mas não o suficiente para que o pico ocorra, determinando a persistência do folículo e prolongando a dominância (MENCHACA & RUBIANES, 2004).

A manipulação do ciclo estral em ovinos é feita principalmente através do uso de progestágenos e, na maioria das vezes, isso é feito sem o conhecimento prévio de qual fase do ciclo estral a ovelha se encontra. Assim, com o emprego de implantes na presença de um corpo lúteo (CL), a concentração de progesterona ficaria aumentada e na ausência do CL, ficaria proporcionalmente reduzida. A atividade e a vida útil dos grandes folículos são encurtadas quando o implante de progesterona é aplicado na presença de um corpo lúteo e é aumentada na ausência de um corpo lúteo (RUBIANES et al., 1996). A persistência destes folículos dominantes pode levar ao envelhecimento destes folículos, diminuindo a fertilidade e o sucesso em programas de sincronização do ciclo estral em ovinos. Uma alternativa para impedir a ovulação de folículos velhos de ondas foliculares anteriores, seria o emprego de maiores doses de progesterona, que causaria a atresia destes folículos antigos, permitindo a ovulação apenas de folículos recentes, da última onda folicular (BARTLEWSKI et al., 2017). Em programa de coleta de embriões ovinos foi observada uma melhora na taxa de fertilização e uma melhora na qualidade dos embriões com o emprego de dose elevada, contendo 30mg de acetato de fluorogestona (FGA) + 400mg de progesterona (SCUDAMORE et al., 1992), indicando que folículos da última onda foram ovulados, os quais estariam melhorando essas taxas.

Com base nesse conjunto de ferramentas, associado ao entendimento da dinâmica folicular pode haver um significativo incremento nos resultados reprodutivos em ovelhas

leiteiras através do conhecimento da dinâmica folicular em ovelhas leiteiras bem como conhecendo a resposta desse crescimento folicular baseado em aplicação hormonal exógena.

### **3 HIPÓTESES**

- A dinâmica folicular de ovelhas leiteiras na estação reprodutiva é diferente daquela existente fora da estação;
- O emprego de pessários com alta concentração de progesterona possibilita a atresia de folículos dominantes antigos, permitindo a ovulação apenas de folículos recentes, da nova onda folicular;
- Pessários com elevada concentração de progesterona possibilitam reduzir o tempo de sua manutenção, desta forma encurtando os protocolos de cobertura em tempo fixo.

### **4 OBJETIVO GERAL**

- Mapear a dinâmica folicular em ovelhas leiteiras, dentro e fora da estação reprodutiva.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mapear a dinâmica de desenvolvimento folicular, durante o período de um ciclo estral, em ovelhas leiteiras, empregando 60 ou 120mg de progesterona, dentro e fora da estação reprodutiva;
- Avaliar a manipulação do ciclo estral com emprego de pessários vaginais contendo baixa (60mg) e alta (120mg) concentração de progesterona;
- Definir um protocolo de sincronização do ciclo estral em ovelhas leiteiras, para ser empregado dentro e fora da estação reprodutiva.

### **5 METODOLOGIA**

#### **5.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS**

Foram utilizadas fêmeas ovinas leiteiras, predominantemente da raça Lacaune, múltíparas, híginas, adultas em idade reprodutiva, em ótimo escore corporal, classificadas como

3 em uma escala de 1 a 5, sendo 1 animal extremamente magro e 5 obeso. Os animais recebiam concentrado a base de milho, soja e núcleo mineral à 0,5% do PV, mais sal mineral para ovinos à vontade, além de pastejo de *Pennisetum clandestinum Hochst* (Capim-quicuí) e de *Cynodon spp* (Tifton-85) e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em Lages/SC com latitude 27° 48' 58" S e longitude 50° 19' 34" W. Esse trabalho foi aprovado junto ao comitê de ética do CAV-UDESC o número 8167261118.

## 5.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

As fêmeas ovinas foram submetidas ao acompanhamento ultrassonográfico diário, durante o período de um ciclo estral, que durou cerca de 17 dias. O experimento foi conduzido dentro da estação reprodutiva nos meses de abril/maio e replicado fora da estação reprodutiva, em outubro/novembro. O acompanhamento em tempo real da dinâmica folicular, foi realizado através de observações ultrassonográficas, realizadas a partir do início do ciclo estral até a próxima ovulação.

Para determinar o início do estro, os animais foram pré-sincronizados com pessários vaginais a base de medroxiprogesterona, em duas concentrações (60mg) ou (120mg). Os pessários foram confeccionados com tampões vaginais humanos OB®, impregnados com medroxiprogesterona dissolvida em álcool 92GL. Foram utilizados tampões de tamanho grande para ovelhas e de tamanho médio para cordeiras. Utilizou-se um protocolo curto, com permanência dos pessários intravaginais por seis dias. No momento da retirada foi aplicado prostaglandina e gonadotrofina coriônica equina (eCG).

O acompanhamento ultrassonográfico foi realizado a partir do momento da retirada do pessário vaginal. Com a aproximação do período de ovulação, o intervalo das observações foi encurtado para 8 horas, permitindo a avaliação do momento mais próximo da ovulação. A ovulação foi definida pela ausência do folículo dominante detectado nos exames ultrassonográfico anteriores.

As fêmeas foram manejadas em posição quadrupedal ou em elevação (figura 1), com a parede abdominal comprimida, técnicas estas usadas para facilitar a visualização do útero e dos ovários. O equipamento de ultrassom (Mindray/DP50) foi utilizado em modo-B tempo real, utilizando transdutor linear retal com frequências variando entre 6 e 8,5MHz, acoplado a um tubo de plástico ligeiramente curvado (medindo 30cm de comprimento) para permitir sua manipulação externamente.

O procedimento era iniciado com a remoção das fezes do reto, seguido da deposição de gel lubrificante no interior do conduto retal e sobre o transdutor, com o objetivo de evitar lesões e melhorar o contato do transdutor com as estruturas internas. Para localizar os ovários, algumas manobras foram necessárias. Quando a bexiga urinária era identificada, os cornos uterinos eram localizados lateralmente. Desta forma, rotacionando o transdutor para esquerda e para a direita, eram observados os ovários e suas estruturas. Cada avaliação ultrassonográfica de cada ovário foi registrada em uma ficha individual existente para cada fêmea. As imagens obtidas também foram gravadas, permitindo a posterior conferência das dimensões e localizações de cada estrutura, de cada ovário e em cada momento avaliado.



Figura 1: Ultrassonografia em estação. Fonte: Próprio autor.

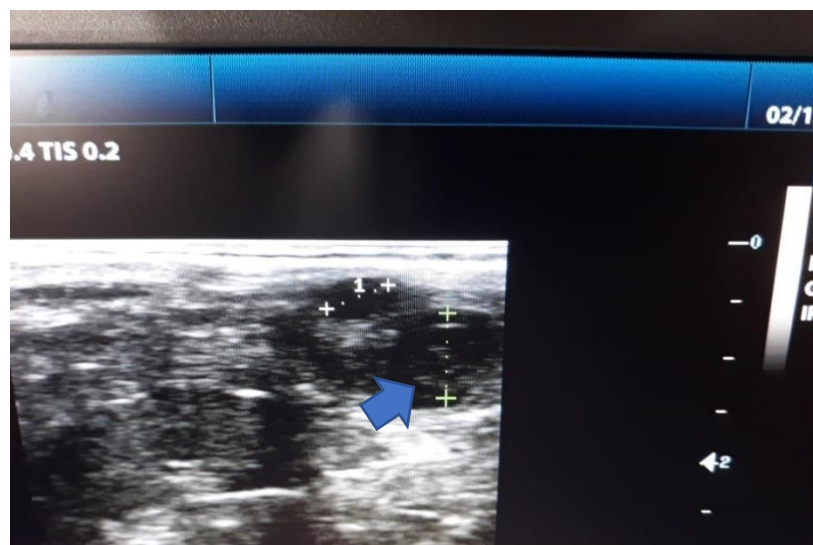


Figura 2: Estruturas ovarianas, folículo dominante (1) e corpo lúteo (seta). Fonte: Próprio autor



Para o estabelecimento da dinâmica folicular, alguns parâmetros de análise foram adotados.

- A onda folicular foi identificada como um grupo de folículos que crescem a partir de 2 ou 3mm, sendo que um ou mais atingiram seu diâmetro máximo;
- O dia da emergência foi considerado quando o maior folículo, ainda com 2 ou 3mm, foi identificado pela primeira vez;
- O diâmetro máximo folicular foi obtido daquele folículo que excedeu o tamanho dos demais, na mesma onda. Quando mais de um folículo alcançou o mesmo diâmetro máximo, aquele que atingiu primeiro este diâmetro, foi considerado o folículo de diâmetro máximo da onda;
- O dia da obtenção do diâmetro máximo, foi aquele dia em que o folículo atingiu seu maior diâmetro;
- A fase de crescimento folicular foi definida como o tempo necessário para que o folículo de maior diâmetro crescesse desde seu menor diâmetro observado;
- A fase de regressão foi definida como o tempo necessário para que o folículo de maior diâmetro reduzisse o seu tamanho até o seu menor diâmetro;
- A fase estática foi considerada como sendo o tempo decorrido desde que o folículo atingiu seu maior diâmetro, no final da fase de crescimento, até o início da fase de regressão;
- A taxa de crescimento foi considerada como a diferença (mm/dia) entre o diâmetro máximo e mínimo, do maior folículo, dividido pela duração do seu crescimento;
- A taxa de regressão (mm/dia) foi calculada pela diferença entre o diâmetro máximo e mínimo, do maior folículo, dividido pela duração de seu período de regressão (dias);

Para a onda ovulatória, além das variáveis descritas, foram computadas:

- O diâmetro ovulatório, que é a medida obtida na última mensuração do folículo, antes da ovulação;
- O número de ovulações, avaliadas como simples, duplas ou triplas por ciclo;
- O número de ovulações nos ovários direito e/ou esquerdo;

Com relação ao ciclo estral foram tabulados os parâmetros referentes:

- Intervalo entre as ondas foliculares e o número de ondas;
- A duração do ciclo estral;

- Na análise da população folicular os folículos foram agrupados pelo tamanho, sendo: pequenos (2 - 3,4mm), médios (3,5 – 4,9mm) e grandes ( $\geq 5$ mm),
- A duração da fase folicular (dias) foi calculada a partir do momento em que o CL desapareceu, até o aparecimento do próximo CL;

Com relação aos corpos lúteos foram computados:

- O dia do volume máximo;
- O dia do início da possível observação por US e o último dia desta observação;
- As dimensões dos CLs provenientes de múltiplas ovulações (2 e 3) e com ovulação simples;
- A duração da fase lútea foi calculada a partir do aparecimento do CL até o dia do seu desaparecimento.
- O tamanho do CL aos 30 dias após a cobertura nos animais com gestação confirmada.

Com relação a taxa de concepção e nascimentos:

- Número de ovelhas prenhes em relação ao total de ovelhas encarneiradas;
- Número de cordeiros nascidos vivos por fêmea parida.

### 5.3 EXPERIMENTO 1 – DINÂMICA FOLICULAR DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO

No primeiro experimento foram utilizadas 40 fêmeas multíparas, que foram divididas em dois grupos de 10 animais em cada estação. Dois grupos foram avaliados nos meses de outubro- novembro (fora da estação) e os outros dois grupos avaliados em abril-maio (dentro da estação). As ovelhas foram pré-sincronizadas com pessários de 60mg ou 120mg de progesterona, associado a uma dose de 400UI de eCG e 75  $\mu$ g de cloprostenol de sódio, no dia da retirada do implante (sexto dia). A avaliação ultrassonográfica foi iniciada 24 horas após a retirada dos implantes, prosseguindo até a ovulação seguinte.

### 5.4 EXPERIMENTO 2 – MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL

No segundo experimento foram utilizadas 40 fêmeas multíparas, divididas em dois grupos de 10 animais em cada estação, sendo dois grupos avaliados nos meses de outubro-

novembro (fora da estação) e os outros dois grupos avaliados em abril-maio (dentro da estação). As fêmeas foram submetidas a protocolos de manipulação de ciclo estral com o uso de pessários vaginais contendo alta (120mg) e baixa (60mg) concentração de progesterona, com o dispositivo permanecendo por um período de seis dias. No momento da retirada do pessário vaginal foi aplicado uma dose de 400UI de eCG e 75 µg de cloprostenol de sódio. As avaliações da dinâmica folicular foram efetuadas desde o momento da inserção do dispositivo de medroxiprogesterona até a ovulação, após a retirada do mesmo.

### 5.5 EXPERIMENTO 3 – TAXA DE CONCEPÇÃO

No terceiro experimento foram utilizadas 69 fêmeas adultas e borregas em idade reprodutiva, divididas em grupos homogêneos, sendo que dentro da estação se utilizou 35 fêmeas e fora da estação 34 fêmeas. Em cada estação as ovelhas foram divididas em dois grupos, sendo que em um se utilizou pessários com 60mg e no outro com 120mg de progesterona. O encarneamento foi realizado com base no momento da ovulação estabelecida pelos experimentos 1 e 2, utilizando monta controlada com um carneiro de reconhecida fertilidade. A confirmação da gestação foi realizada pelo exame ultrassonográfico transretal, realizado 30 dias após a cobertura. Foram avaliadas e comparadas entre os dois grupos, a taxa de concepção nos dois protocolos, o número de cordeiros nascidos e o tamanho do corpo lúteo aos 30 dias após cobertura. Também se avaliou o efeito da estação, o efeito da concentração de progesterona e a interação entre esses fatores.

### 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados qualitativos (taxa de concepção e número de cordeiros) foram submetidos ao teste Qui Quadrado e os demais dados submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS®. Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O modelo estatístico usado incluiu como variáveis explanatórias o efeito da estação, da concentração de progesterona e da interação entre esses.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ADAMS, G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **J Reprod Fertil Suppl**, Canadá, v. 54, p. 17-32, 1999.
- AUDICANA, L., AUGHEY, E., O'SHAUGHNESSY, P. J. Sensitivity of the early luteal phase ovine cervix to prostaglandin E2 (PGE2) and expression of EP3 receptor mRNA. **Research in Veterinary Science**, Escócia, v.64, p.177-179. 1998.
- AZEVEDO, D. M. M. R.; MARTINS FILHO, R.; ALVES, A. A.; ARAÚJO, A. A. de; BRAGA LÔBO, R. N. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia – PUBVET**, Brasil, v.2, n.6, Art. 140. 2008.
- BAIRD, D. T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. **J. Reprod. Fertil**, Escócia, v. 69, p. 343-352, 1983.
- BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, Canadá, v. 61, p. 311-327, 2004.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics during anoestrous in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Canadá, v.113, n.1, p. 275-285, 1998.
- BARTLEWSKI, P. M.; SOHAL, J.; PARAVINJA, V.; BEBÉ, T.; OLIVEIRA, M. E. F.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; ZIEBA, D. A.; KEISLER, D. H. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, Nova York, v. 58, p. 30-38, 2017.
- BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MARIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. Brasil, v.33, (Supl 1), p.127-130, 2005.
- BOSCOS, C. M.; SAMARTZ, F. C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrous synchronization of sheep. **Theriogenology**, Grécia, v. 58, n. 1, p. 1261-1272, 2002.
- BRAND, A.; JONG, W. H. R. Qualitative and quantitative micromorphological investigation of tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, Países Baixos, v. 33, n. 1, p. 431-439, 1973.
- BROGNI, C. F. & SOUZA, A. F. D. E. Ultrasonography in Sheep Follicular Dynamics. **Open Journal of Agricultural Research**, Brasil, v. 1, n.1, p. 25–29, 2021.
- CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**, Reino Unido, v. 49, p. 335-350, 1995.

CSEH, V.; FAIGL, G.S., AMIRIDIS, S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, Hungria, v.130, p.187-192. 2012.

CUMMING, I. A.; BROWN, J. M.; BLOCKEY, M. A.; GODING, J. R. Regulation of oestrous cycle in the ewe. **Journal Reproduction Fertillity**, Austrália, v. 24, n. 1, p. 148-159, 1971.

DRIANCOURT, M. A.; GIBSON, W. R.; CAHILL, L. P. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. **Reproduction Nutrition Development**, Austrália, v. 25, n. 1A, p. 1-15, 1985.

EVANS A. C. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Anim Reprod Sci**, Irlanda, v. 78, p. 289-306, 2003.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats, Sydney: **Butterworths**, 99p. 1987.

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

FONSECA, J.F., ZAMBRINIA, F.N., ALVIMB, G.P., PEIXOTO, M.G.C.D., VERNEQUE, R.S., VIANA, J.H.M. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. **Small Ruminant Research**, Brasil, v.111, p.96-99. 2013

FONSECA, J.F., SOUZA-FABJAN, J.M.G., OLIVEIRA, M.E.F., LEITE, C.R., NASCIMENTO, PENIDO, P.M.P., BRANDÃO, F.Z. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, Brasil, v.86, p.144-151. 2016.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod**, Nova York, v. 50, p. 225-232, 1994.

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**, Estados Unidos, v. 43, n. 1, p. 689-703, 1995.

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. **Anim. Reprod. Sci**, Espanha, v. 65, p. 265-272, 2001.

GONZALEZ-BULNES, A.; SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. **Anim. Reprod. Sci**, Espanha, v. 84, p. 107-119, 2004.

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A. Ovarian follicular dynamics and dominance effect in sheep. Societa Italiana di fisiologia Veterinaria. **VI congress Nazionale**. Stointino (Sassari), Itália, Guigo, p. 2-4, 2005.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R. Falhas reprodutivas em machos. IN: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds). **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., SHARPE, P., BUCKRELL, B.C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, Canadá, v.33, p.1231-43. 1990.

HUTCHINSON, J. S. M. & ROBERTSON, H. A. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. **Res. vet. Sci**, Escócia, v. 7, p. 17, 1966.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Austrália, v.62, p.113-141, 2000.

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

LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. **Theriogenology**, Espanha, v. 52, p. 505-514, 1999.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Estados Unidos, 3-4. ed., v.25, p.177-195, set./dez. 2004.

MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO A.G. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined shortterm GnRH, PGF2 and estradiol benzoate treatments. **Small Ruminant Research**, Itália, v.93, p.41-47. 2010.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, Uruguai, v.16, n.1, p.403-413, 2004.

MIURA R. Physiological characteristics and effects on fertility of the first follicular wave dominant follicle in cattle. **J Reprod Dev**, Japão, v. 65, n. 4, p. 289-295, 2019.

NOËL, B.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. **Journal of reproduction and fertility**, Bélgica, v. 99, n. 2, p. 695-700, 1993.

OLIVEIRA, M. E. F. Influência da sazonalidade na reprodução das ovelhas e cabras. Radar Técnico-Ovinos e Caprinos, **MilkPoint**, Brasil, 2012. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/influencia-dasazonalidade-na-reproducao-das-ovelhas-e-cabras-81049n.aspx>>. Acesso em: 14 jul. 2022 às 10:00 horas.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C.; ADAMS, G. P. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. **Journal of reproduction and fertility**, Canadá, v. 101, n. 2, p. 501-9,1994.

RUBIANES E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2alpha. **Anim Reprod Sci**, Uruguai, v. 78, p. 47-55, 2003a.

- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Anim Reprod Sci**, , Uruguai, v. 78, p. 271-287, 2003b.
- RUBIANES, E.; DE CASTRO, T.; CARVAJAL, B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonographically monitored ewes. **Can. J. Anim. Sci**, , Uruguai, v. 76, p. 473-475, 1996.
- SCHRICK, F. N.; SURFACE, R. A.; PRITCHARD, J. Y.; DAILEY, R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of reproduction**, Estados Unidos, v. 49, n. 5, p. 1133-1140, 1993.
- SCUDAMORE, C. L.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P. & ROBERTSON, I. S. A comparison of two dosages of fluorogestone acetate in pessaries on the quality of embryos recovered from superovulated ewes. **Theriogenology**, Escócia, v. 37, p. 445-456, 1992.
- SOUZA C. J. H.; Campbell, B. K.; Baird, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **J Reprod Fertil**, Reino Unido, v. 108, p. 101-106, 1996.
- SRINIVASAN, V.; SPENCE, W. D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.; BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**, Índia, v.25, n.12, p.779– 785,2009.
- THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animal Endocrinology**, França, v.23, p.87-100, 2002.
- VALENTIM, R. C.; CORREIA, T. M.; AZEVEDO, J. M. T. de. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. **Alb'eitar, Publicação Veterinária Independentem**,Portugal v.2, n.6, p.18-22v, 2006.
- VILARIÑO, M.; CUADRO, F.; DOS SANTOS-NETO, P. C.; GARCÍA-PINTOS, C.; MENCHACA, A. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandinbased protocol Synchrovine for FTAI in sheep. **Theriogenology**, Uruguai, v. 90, p. 163–168, 2017.
- VINOLES, C.; RUBIANES, E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes, **Can. J Anim Sci**, Uruguai, v. 78, p. 429-431, 1998.
- WU, D.; BARRETT, D. M. W.; RAWLINGS, N. C.; GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M. Relationships of changes in ultrasonographic image attributes to ovulatory and steroidogenic capacity of large antral follicles in sheep. **Animal Reproduction Science**, Canadá, v. 116, n. 1, p. 73-84, 2009.
- WULSTER-RADCLIFFE, M.C.S., WANG, G., LEWIS, S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990–1002. 2004.
- ZIEBA, D. A.; KIRSZ, K.; MOLIK, E.; ROMANOWICZ, K.; WOJTOWICZ, A. K. Effects of orexigenic peptides and leptin on melatonin secretion during different photoperiods in seasonal breeding ewes: An in vitro study. **Domestic Animal Endocrinology**, Polônia, v.40, p.139–146, 2011.

## 6 ARTIGO 1 – DINÂMICA FOLICULAR EM OVELHAS LEITEIRAS DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA, EMPREGANDO ALTA OU BAIXA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA NA SINCRONIZAÇÃO.

### 6.1 RESUMO

**Background:** Follicular dynamics is already studied in ewes, although with conflicting results, initially. Currently, there is a consensus on the existence of high variation in the number of follicles in each wave and a variability in the number of waves in each estrous cycle. However, follicular dynamics in dairy ewes is still poorly understood. Considering that these animals needed parturition throughout the year, this project aimed to evaluate, the follicular dynamics of dairy ewes, inside and outside the breeding season. Additionally, it was evaluated the effect of two progesterone concentrations (60 and 120mg) used in vaginal pessaries.

**Materials, Methods & Results:** The experiment was performed in April/May (breeding season), and in October/November (out of season), using healthy multiparous dairy ewes, predominantly of Lacaune breed, which were submitted to daily ultrasound examinations. In the breeding season, the number of ovulations (1.35 vs 1.05), the diameter of the ovulatory follicle (5.97 vs 5.05), the luteal phase (11 vs 9.14 days) and the duration of the estrous cycle (16.83 vs 16.6 days) were higher compared to out of season, respectively. Out of the season ewes do not shown corpus luteum, characterizing anestrus. The number of small follicles is higher during season in first (4.42 vs 2.16), second (3.27 vs 2.08) and third (4.05 vs 2.08) waves compared to out of season, respectively. In the fourth wave, a greater number of medium follicles appear in the reproductive season (2 vs 1), evidencing higher ovarian activity.

**Discussion:** This is the first report characterizing ovarian follicular development in dairy ewes. Even with a smaller duration of the follicular phase, the ovulatory follicle shown higher diameter in the reproductive season, suggesting greater viability and quality of the ovulated oocyte. Application of exogenous progesterone expand the luteal phase in the breeding season (11 vs 9.14 days), evidencing that high progesterone concentrations delay luteolysis without interfering with CL size. The anestrus observed out of the season suggests the need of higher progesterone concentration in reproductive protocols. A greater number of small follicles (less than 3.4 mm) were observed in the first, second and third follicular waves, in the reproductive season, demonstrating a greater follicular recruitment in this period, possibly due to the higher activity of circulating FSH in the reproductive season. Finally, the breeding season did not change the time of ovulation, after ovulatory follicle emergence. Thus, it is possible to adapt



reproductive protocols for different seasons, suggesting the use of vaginal pessaries with a higher concentration of progesterone (120mg) outside the breeding season.

Key-words: Estrus, Follicular development, Ultrasonography, Reproductive season, Progesteron implants, FTAI.

## 6.2 INTRODUÇÃO

A dinâmica folicular vem sendo estudada em ovelhas, embora com controvérsias nos trabalhos iniciais, que descreveram os padrões de desenvolvimento folicular na espécie. Alguns autores relatam um crescimento folicular contínuo e independente do estágio do ciclo estral (HUTCHINSON E ROBERTSON, 1966), enquanto outros descrevem um padrão de desenvolvimento em ondas (NOËL et al., 1993). Atualmente, existe um consenso unindo os dois pontos de vista, o qual se baseia na alta variabilidade no número de folículos em cada onda e na grande variabilidade no número de ondas a cada ciclo estral (EVANS, 2003). Dessa forma, folículos  $\geq 5$  mm de diâmetro exibem um padrão de crescimento semelhante, enquanto folículos menores que 4 mm crescem aleatoriamente (SOUZA et al., 1996). Em ovelhas, a ultrassonografia ovariana demonstrou que ocorre a emergência de onda folicular a cada 5 dias, aproximadamente (EVANS, 2003) e que o corpo lúteo já é sensível à  $PGF2\alpha$  aos 3 dias após a ovulação (RUBIANES & MENCHACA, 2003a), já a dominância folicular apresenta padrões de crescimentos variados. Folículos menores que 4mm, crescem de forma aleatória, podendo aparecer em número variado e de várias maneiras durante as ondas de crescimento folicular, em um ciclo estral. Já folículos maiores de 5mm tem padrões de crescimento em ondas, ou seja, aparecem menos dispersos e de forma mais concentrada durante o ciclo estral (GONZALEZ-BULNES & VEIGA-LOPEZ, 2005).

Os folículos pré-ovulatórios de cada onda secretam elevada quantidade de inibina A e estradiol, causando a redução da concentração de FSH e a atresia de folículos menores (BAIRD, 1983). No entanto, o folículo dominante evita sua própria regressão, ao mudar sua dependência de FSH para LH (CAMPBELL et al., 1995). Embora os folículos presentes nos ovários no momento da emergência sejam inibidos, ocorre o surgimento de novos folículos no ovário, porém seu crescimento subsequente é suprimido (GONZALEZ-BULNES et al., 2001). A fase lútea interfere no crescimento folicular. Quando a concentração de LH é baixa, os folículos tornam-se criticamente dependentes do FSH, sem que seja estabelecida uma dominância. Esta baixa concentração de LH explica os efeitos supressores da progesterona do corpo lúteo nos folículos dominantes em ovelhas (ADAMS, 1999). Há uma falta de dominância durante a fase lútea, até a luteólise, quando a secreção de LH aumenta por um incremento na secreção de

estradiol pelos folículos pré-ovulatórios (BAIRD, 1983), determinando que a dominância se torne evidente (LOPEZ-SEBASTIAN et al., 1999). A permanência dos grandes folículos é encurtada quando se aplica um implante de progesterona na presença de um corpo lúteo e é aumentada na ausência de corpo lúteo (RUBIANES et al., 1996). A persistência destes folículos dominantes ocasiona seu envelhecimento, reduzindo a fertilidade. A alternativa para impedir a ovulação destes folículos velhos é o emprego de doses elevadas de progesterona, que causaria a atresia destes folículos antigos, oportunizando que apenas folículos da última onda folicular cheguem a ovulação (BARTLEWSKI et al., 2017).

Assim, o adequado entendimento da dinâmica folicular poderá possibilitar protocolos que incrementem os índices reprodutivos em ovelhas leiteiras. Desta forma, este estudo teve por objetivos caracterizar a dinâmica folicular de ovelhas leiteiras, dentro e fora da estação reprodutiva e adicionalmente avaliar o efeito do emprego de pessários vaginais contendo alta (120mg) ou baixa (60mg) concentração de progesterona na sincronização dosaios.

### 6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido dentro da estação reprodutiva nos meses de abril/maio e fora da estação em outubro/novembro, para determinar o comportamento folicular em cada momento. Esse trabalho foi aprovado junto ao comitê de ética sob o número 8167261118.

#### 6.3.1 Seleção dos animais

Foram utilizadas fêmeas ovinas leiteiras, predominantemente da raça Lacaune, múltíparas, hígdas, adultas em idade reprodutiva, em ótimo escore corporal, classificadas como 3 em uma escala de 1 a 5, sendo 1 animal extremamente magro e 5 obeso. Os animais recebiam concentrado a base de milho, soja e núcleo mineral à 0,5% do PV, mais sal mineral para ovinos à vontade, além de pastejo de *Pennisetum clandestinum Hochst* (Capim-quicuí) e de *Cynodon spp* (Tifton-85) e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em Lages/SC com latitude 27° 48' 58" S e longitude 50° 19' 34" W. Esse trabalho foi aprovado junto ao comitê de ética do CAV-UDESC o número 8167261118.

#### 6.3.2 Avaliação ultrassonográfica

Para o exame, as fêmeas foram manejadas em posição quadrupedal ou em elevação e com a parede abdominal comprimida (BROGNI & SOUZA, 2021). O equipamento de

ultrassom (Mindray/DP50) foi utilizado em modo-B tempo real, com transdutor linear retal com frequências variando entre 6 e 8,5MHz, acoplado a um tubo de plástico ligeiramente curvado (medindo 30cm de comprimento), permitindo a manipulação externa. Inicialmente procedia-se a remoção das fezes do reto, seguido da deposição de 5 a 10mL de gel no conduto retal e sobre o transdutor.

As ovelhas foram submetidas ao acompanhamento ultrassonográfico diário, durante o período de um ciclo estral, aproximadamente 17 dias. As ultrassonografias foram realizadas desde o início do ciclo estral, até a próxima ovulação.

Para determinar o início do ciclo estral, os animais foram pré-sincronizados com pessários vaginais a base de medroxiprogesterona, em duas concentrações (60mg) ou (120mg), mantidos por seis dias. No momento da retirada dos pessários foi aplicado prostaglandina (75 µg de cloprostenol de sódio) e gonadotrofina coriônica equina eCG (400UI) e a partir de então as ultrassonografias foram realizadas diariamente. Com o aumento do diâmetro folicular e a proximidade da ovulação, as avaliações passaram a ser realizadas a cada 8 horas, permitindo detectar o momento da ovulação. A ocorrência da ovulação foi definida pela ausência do folículo dominante detectado nos exames ultrassonográfico anteriores, caracterizando então o início do ciclo estral. Cada avaliação ultrassonográfica de cada ovário foi registada em fichas individuais e as imagens obtidas foram gravadas, permitindo a posterior conferência das dimensões e localização de cada estrutura.

### **6.3.3 Análise Estatística dos Dados**

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS®. Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O modelo estatístico usado incluiu como variáveis explanatórias o efeito da estação, da concentração de progesterona e da interação entre esses.

## **6.4 RESULTADOS**

Como demonstrado na tabela 1, quando comparado apenas o período dos tratamentos, verificou-se maior número de ovulações na estação (1,35), em relação a fora da estação (1,05). Também foi observado maior diâmetro médio dos folículos na estação (5,97mm), em relação a fora da estação (5,05mm). Ocorreu ainda uma variação na duração da fase lútea, que foi mais

prolongada dentro da estação (11 dias), contra 9,14 dias fora da estação. Como consequência, a duração da fase folicular foi mais curta na estação (6,25 dias), contra 7,37 fora da estação. Por fim, a duração do ciclo estral foi maior na estação (16,83 dias) em relação ao período fora da estação (16,60 dias). Ainda neste quesito, quando foi considerada a concentração de progesterona empregada, verificou-se que a duração do ciclo estral na estação, com a utilização de 60mg progesterona (16,75 dias) foi semelhante a duração do ciclo fora da estação, independente da dose utilizada (Tabela 1). Nas avaliações realizadas fora da estação, as ovelhas não apresentavam corpo lúteo, caracterizando uma condição de anestro. Quando correlacionados os dois períodos (estação x fora da estação) e doses (120mg x 60mg) de progesterona, foi observado efeito das doses para número de ovulações, diâmetro do folículo ovulatório, duração da fase lútea, duração da fase folicular e duração total do ciclo estral (Tabela 1).

Fora da estação, os grupos 60mg e 120mg apresentaram valores menores para número de ovulações, diâmetro do folículo ovulatório, duração da fase lútea e duração total do ciclo estral, quando comparadas com as mesmas variáveis e doses na estação reprodutiva. Como se observa na tabela 2, houve influência em uma série de quesitos, em função dos tratamentos serem realizados dentro ou fora da estação reprodutiva. O CL foi observado mais precocemente na estação (4,1 dias) em relação a fora da estação reprodutiva (5,75 dias). O maior diâmetro do CL foi observado aos 12,47 dias na estação, contra 10,55 dias fora da estação reprodutiva (Tabela 2). Também houve variação em relação ao último dia de observação do CL, que ocorreu com 14,31 dias na estação contra 12,40 dias, fora da estação reprodutiva.

Quando foi correlacionado os períodos de avaliações (estação x fora da estação) e doses de progesterona (60mg x 120mg), observou-se diferenças para as mesmas variáveis acima descritas, sendo que fora da estação, o CL foi inicialmente observado com 5,85 dias com 60mg e 5,65 dias com 120mg de progesterona. Já na estação reprodutiva isto ocorreu mais precocemente, com o CL inicialmente observado com 4,30 dias com 60mg e 4,40 dias com 120mg de progesterona (Tabela 2). O maior diâmetro do CL também foi influenciado pelos grupos (estação x fora da estação) e doses de progesterona (60 x 120mg). Na estação o máximo diâmetro do CL ocorreu aos 12,50 dias com 60mg e aos 12,44 dias com 120mg. Já fora da estação o máximo diâmetro do CL ocorreu mais precocemente, aos 10,57 dias com 60mg e aos 10,53 dias com 120mg (Tabela 2). Finalmente, na estação, o último dia de observação do CL foi mais tardio, ocorrendo aos 14,30 dias do ciclo, com 60mg e aos 14,33 dias com 120mg de progesterona, contra 12,38 dias com 60mg e 12,42 dias com 120mg de progesterona, fora da estação (Tabela 2).

Em relação ao número de folículos que se desenvolvem no ovário, foi observado que o número de folículos menores que 3,4mm é maior dentro da estação, em relação ao período fora da estação, tanto na primeira onda (4,42 versus 2,16), quanto na segunda (3,57 versus 2,08), na terceira onda (4,05 e 1,19) e na quarta onda (4,16 versus 2), respectivamente para dentro e fora da estação. Ainda, na quarta onda, foi observado maior número de folículos médios (3,5-4,9mm), dentro da estação (dois), quando comparado ao período fora de estação (apenas um). Foram observadas diferenças entre alguns parâmetros das distintas ondas e períodos de avaliação (Tabela 3). Na primeira onda, o folículo dominante alcançou seu tamanho máximo aos 5,51 dias dentro da estação e aos 4,60 dias fora da estação. O mesmo foi observado para o FD da quarta onda que alcançou seu tamanho máximo com 16,85 dias dentro da estação, contra 16,25 dias fora da estação.

O dia de emergência do folículo de maior diâmetro não foi diferente na primeira, segunda e terceira onda, dentro ou fora da estação. Porém, na quarta onda houve diferença, ocorrendo a emergência do folículo ovulatório aos 13,16 dias dentro da estação, e aos 12 dias fora da estação. Também foi observado diferença no diâmetro máximo do folículo ovulatório da quarta onda, sendo maior dentro da estação (5,88mm) e menor fora da estação reprodutiva (5,05mm).

Em relação à duração da fase estática, houve diferença na primeira onda, sendo que dentro da estação essa fase durou 0,98 dias, contra 1,21 dias fora da estação. O mesmo foi observado na quarta onda, onde a duração da fase estática foi menor dentro da estação, com 0,80 dias, comparado com 1,16 dias fora da estação.

A fase de crescimento, que determina por quanto tempo o folículo dominante de cada onda ficou em crescimento, foi maior na terceira onda, onde o período de crescimento foi de 4,06 dias dentro da estação e 3,45 dias fora da estação.

Em relação a fase de regressão, foi observado um período maior na primeira e na segunda onda, dentro da estação, 3,18 e 3,43 dias, respectivamente, quando comparado com o período fora da estação, com 2,61 e 2,65 dias, respectivamente.

Em relação a taxa de crescimento, que relaciona quanto o folículo dominante de cada onda cresceu diariamente, foram observadas diferenças entre a primeira e segunda ondas na estação, com valores menores (0,63 e 0,68mm/dia), em relação ao período fora da estação (1,01 e 0,78mm/dia), respectivamente. Já para a quarta onda foi observado o inverso, valores maiores foram observados na estação (1,25mm/dia), quando comparado ao período fora da estação (0,87mm/dia). Na variável, intervalo entre ondas, não houve diferença entre os períodos nas diferentes ondas.

Tabela 1- Valores médios  $\pm$  D.P. para número de ondas foliculares por ciclo estral, taxa de ovulação, diâmetro do folículo ovulatório, duração da fase lútea em dias, duração da fase folicular em dias e duração do ciclo estral em dias, de acordo com a época do ano (dentro e fora da estação) e com duas concentrações de progesterona (60 e 120mg), em ovelhas leiteiras. Ciclo completo após a retirada do implante.

| Grupos     | Ondas por ciclo $\pm$ D.P. | Número de ovulações $\pm$ D.P. | Diâmetro do FO (mm) $\pm$ D.P. | Fase lútea dias $\pm$ D.P.    | Fase folicular dias $\pm$ D.P. | Ciclo estral dias $\pm$ D.P.   |
|------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| DENTRO     | 3,35 $\pm$ 0,15            | 1,35 $\pm$ 0,36 <sup>A</sup>   | 5,97 $\pm$ 0,058 <sup>A</sup>  | 11,00 $\pm$ 0,17 <sup>A</sup> | 6,25 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>   | 16,83 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>  |
| FORA       | 3,16 $\pm$ 0,19            | 1,05 $\pm$ 0,52 <sup>B</sup>   | 5,05 $\pm$ 0,078 <sup>B</sup>  | 9,14 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup>  | 7,37 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>   | 16,60 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>  |
| DENTRO 60  | 3,20 $\pm$ 0,21            | 1,25 $\pm$ 0,33 <sup>A</sup>   | 5,98 $\pm$ 0,079 <sup>A</sup>  | 10,95 $\pm$ 0,23 <sup>A</sup> | 6,30 $\pm$ 0,23 <sup>B</sup>   | 16,75 $\pm$ 0,07 <sup>AB</sup> |
| DENTRO 120 | 3,50 $\pm$ 0,23            | 1,44 $\pm$ 0,26 <sup>A</sup>   | 5,95 $\pm$ 0,084 <sup>A</sup>  | 11,05 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup> | 6,20 $\pm$ 0,25 <sup>B</sup>   | 16,92 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>  |
| FORA 60    | 3,16 $\pm$ 0,19            | 1,00 $\pm$ 0,43 <sup>B</sup>   | 5,03 $\pm$ 0,072 <sup>B</sup>  | 9,12 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup>  | 7,35 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>   | 16,62 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>  |
| FORA 120   | 3,18 $\pm$ 0,19            | 1,10 $\pm$ 0,48 <sup>B</sup>   | 5,09 $\pm$ 0,075 <sup>B</sup>  | 9,16 $\pm$ 0,25 <sup>B</sup>  | 7,39 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>   | 16,58 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>  |

<sup>AB</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, quando comparadas entre colunas de mesmo agrupamento (P<0,05).

Tabela 2- Valores médios  $\pm$  D.P. para tamanho máximo do corpo lúteo (mm), ovulação em dias após a observação da emergência do folículo ovulatório, dia da observação do CL, último dia da observação do CL e dia do máximo diâmetro do CL, em função da dose de progesterona (60 e 120mg) e épocas do ano (dentro e fora da estação), em ovelhas leiteiras. Ciclo completo após a retirada do implante.

| GRUPOS     | Tamanho máximo CL (mm) $\pm$ D.P | Ovulação em dias após emergência do FO $\pm$ D.P | Início da observação do CL dias $\pm$ D.P | Final da observação do CL dias $\pm$ D.P | Dia do tamanho máximo do CL $\pm$ D.P |
|------------|----------------------------------|--|---|--|---------------------------------------|
| DENTRO     | 11,30 $\pm$ 0,12                 | 4,06 $\pm$ 0,15                                  | 4,10 $\pm$ 0,058 <sup>B</sup>             | 14,31 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>            | 12,47 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>         |
| FORA       | 11,20 $\pm$ 0,15                 | 4,42 $\pm$ 0,19                                  | 5,75 $\pm$ 0,078 <sup>A</sup>             | 12,40 $\pm$ 0,14 <sup>B</sup>            | 10,55 $\pm$ 0,19 <sup>B</sup>         |
| DENTRO 60  | 11,15 $\pm$ 0,17                 | 3,95 $\pm$ 0,21                                  | 4,30 $\pm$ 0,079 <sup>B</sup>             | 14,30 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>            | 12,50 $\pm$ 0,22 <sup>A</sup>         |
| DENTRO 120 | 11,45 $\pm$ 0,18                 | 4,17 $\pm$ 0,23                                  | 4,40 $\pm$ 0,084 <sup>B</sup>             | 14,33 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup>            | 12,44 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>         |
| FORA 60    | 11,22 $\pm$ 0,15                 | 4,44 $\pm$ 0,19                                  | 5,85 $\pm$ 0,078 <sup>A</sup>             | 12,38 $\pm$ 0,14 <sup>B</sup>            | 10,57 $\pm$ 0,19 <sup>B</sup>         |
| FORA 120   | 11,18 $\pm$ 0,17                 | 4,42 $\pm$ 0,17                                  | 5,65 $\pm$ 0,076 <sup>A</sup>             | 12,42 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>            | 10,53 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>         |

<sup>AB</sup>Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, quando comparadas entre colunas de mesmo agrupamento (P<0,05).

Tabela 3- Valores médios  $\pm$ D.P. para dia da emergência do folículo de maior diâmetro, maior diâmetro (mm), do folículo dominante (FD), dia do diâmetro máximo do FD, fase estática em dias do FD, fase de crescimento em dias do FD, fase de regressão do FD em dias, taxa de crescimento mm/dia do FD, taxa de regressão mm/dia do FD e intervalo entre ondas, para cada onda do desenvolvimento folicular, dentro e fora da estação.

| Variáveis                         | Onda 1                       |                              | Onda 2                        |                               | Onda 3                        |                               | Onda 4                        |                               |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                   | Dentro                       | Fora                         | Dentro                        | Fora                          | Dentro                        | Fora                          | Dentro                        | Fora                          |
| Dia da emergência do              | 0,88 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup> | 0,87 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup> | 6,26 $\pm$ 0,42 <sup>A</sup>  | 6,56 $\pm$ 0,42 <sup>A</sup>  | 11,00 $\pm$ 1,03 <sup>A</sup> | 11,68 $\pm$ 1,10 <sup>A</sup> | 13,16 $\pm$ 0,81 <sup>A</sup> | 12,00 $\pm$ 0,90 <sup>B</sup> |
| <u>Folículo de maior diâmetro</u> |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Maior diâmetro do                 | 4,36 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup> | 4,40 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup> | 4,19 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup>  | 4,35 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup>  | 5,43 $\pm$ 0,53 <sup>A</sup>  | 5,01 $\pm$ 0,60 <sup>A</sup>  | 5,88 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 5,05 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>  |
| <u>FD</u>                         |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Dia do diâmetro Máximo            | 5,15 $\pm$ 0,51 <sup>A</sup> | 4,60 $\pm$ 0,52 <sup>B</sup> | 10,68 $\pm$ 0,82 <sup>A</sup> | 10,26 $\pm$ 0,82 <sup>A</sup> | 15,40 $\pm$ 1,54 <sup>A</sup> | 15,89 $\pm$ 1,59 <sup>A</sup> | 16,85 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup> | 16,25 $\pm$ 0,44 <sup>B</sup> |
| <u>do FD</u>                      |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Fase estática em dias             | 0,98 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup> | 1,21 $\pm$ 0,23 <sup>B</sup> | 1,00 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>  | 1,04 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>  | 0,91 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>  | 0,96 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 0,80 $\pm$ 0,31 <sup>B</sup>  | 1,16 $\pm$ 0,38 <sup>A</sup>  |
| <u>do FD</u>                      |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Fase de crescimento em            | 4,15 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup> | 3,90 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup> | 4,21 $\pm$ 0,63 <sup>A</sup>  | 3,87 $\pm$ 0,63 <sup>A</sup>  | 4,06 $\pm$ 0,55 <sup>A</sup>  | 3,45 $\pm$ 0,60 <sup>B</sup>  | 2,96 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 2,85 $\pm$ 0,17 <sup>A</sup>  |
| <u>dias do FD</u>                 |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Fase de regressão do FD           | 3,18 $\pm$ 0,32 <sup>A</sup> | 2,61 $\pm$ 0,32 <sup>B</sup> | 3,43 $\pm$ 0,50 <sup>A</sup>  | 2,65 $\pm$ 0,50 <sup>B</sup>  | 2,83 $\pm$ 1,04 <sup>A</sup>  | 2,50 $\pm$ 1,10 <sup>A</sup>  | _____                         | _____                         |
| <u>em dias</u>                    |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Taxa de crescimento               | 0,63 $\pm$ 0,18 <sup>B</sup> | 1,01 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup> | 0,68 $\pm$ 0,1 <sup>B</sup>   | 0,78 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup>  | 0,88 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 1,25 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>  | 0,87 $\pm$ 0,13 <sup>B</sup>  |
| <u>mm/dia do FD</u>               |                              |                              |                               |                               |                               |                               |                               |                               |
| Taxa de regressão                 | 1,30 $\pm$ 0,27 <sup>A</sup> | 1,40 $\pm$ 0,27 <sup>A</sup> | 1,06 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>  | 1,09 $\pm$ 0,26 <sup>A</sup>  | 1,16 $\pm$ 0,54 <sup>A</sup>  | 1,10 $\pm$ 0,52 <sup>A</sup>  | _____                         | _____                         |

<sup>AB</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, quando comparadas entre linhas de colunas de mesmo agrupamento (P<0,05).



## 6.5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato do comportamento do desenvolvimento folicular ovariano em ovelhas leiteiras. Foi avaliado o desenvolvimento cronológico das estruturas ovarianas durante o período de um ciclo estral completo, o que foi repetido em dois momentos distintos, dentro e fora da estação reprodutiva. Adicionalmente, também foi avaliado o efeito do emprego de duas concentrações de progesterona (60 e 120mg), utilizadas no processo de sincronização dos cios. A duração média do ciclo estral foi de  $16,83 \pm 0,05$  dias dentro da estação reprodutiva. GOODMAN (1994) e BROGNI & SOUZA, (2021) observaram uma média de  $17 \pm 1$  dias. Neste estudo foi observado que a época do ano exerce influência na duração do ciclo estral, havendo uma redução de sua duração fora da estação reprodutiva, com  $16,60 \pm 0,06$  dias contra  $16,83 \pm 0,05$  dias na estação reprodutiva ( $P < 0,05$ ), independente das concentrações de progesterona utilizadas na sincronização.

O número de ondas de desenvolvimento folicular durante o ciclo estral, em cada grupo foi semelhante, mesmo sendo observada uma variação na duração da fase folicular, em função da estação reprodutiva. Isto é explicado pela taxa de regressão entre as ondas ser semelhante nos diferentes grupos, bem como pelo intervalo similar entre as ondas. Em contraste, SEEKALLU (2010) observou diferenças no intervalo entre ondas para ovelhas com 3 ou 4 ondas. Essa discrepância pode estar relacionada com a aptidão das ovelhas usadas em cada experimento. Os ciclos estrais naturais apresentam de 3 a 7 dias de intervalo entre a emergência de ondas foliculares (MENCHACA et al., 2010). Os resultados obtidos neste estudo variaram entre 3,80 e 5,56 dias, não sendo observado qualquer efeito do período em que foram executadas as avaliações (dentro x fora da estação). Foi observado neste estudo que ovelhas com 4 ondas foliculares apresentaram menores intervalos de emergência de ondas quando comparadas com as com 3 ondas foliculares, o que está em acordo com o observado por OLIVEIRA (2011), que afirma que o número de ondas foliculares pode interferir no período de sua emergência. Sabe-se que a raça e a estação podem influenciar a incidência de ovulação em ovelhas (LAMBERSON & THOMAS, 1982).

As raças leiteiras, em especial a Lacaune, costumam ter grande incidência de partos gemelares, indicando um número alto de ovulações. Durante o estudo, foi observado uma variação no número de ovulações, com maior taxa de ovulação (1,35) dentro da estação, em comparação com o período fora da estação (1,05). Isso demonstra que, embora as ovelhas de raças leiteiras possam ser induzidas a ter atividade sexual durante todo o ano, no período de atividade reprodutiva natural, existe uma maior sensibilização do protocolo de sincronização, o que

proporciona um número maior de duplas ovulações (BABY & BARTLEWSKI, 2011).

Na onda ovulatória foi observado maior diâmetro do folículo dominante na estação reprodutiva, com média de 5,97mm. Já fora da estação, o diâmetro máximo foi de 5,05mm, mesmo com uma maior duração da fase folicular nesse período (7,37 dias), o que disponibilizaria mais tempo para o crescimento. Este menor diâmetro deve-se provavelmente, a mecanismos de dominância e feedback, ainda pouco conhecidos em ovelhas (BABY & BARTLEWSKI, 2011), principalmente as de aptidão leiteira (TALAFHA & ABABNEH, 2011), bem como ao fato destas fêmeas apresentarem-se em anestro, fora da estação. Em contrapartida, no período reprodutivo, mesmo com uma menor duração da fase folicular (6,25 dias), esse tempo permitiu ao folículo dominante atingir quase 6mm, ainda assim menor do que em ovelhas deslanadas e não leiteiras. Esse fato pode ser devido ao efeito da lactação nessas ovelhas especializadas, que pode interferir na regulação endócrina da dinâmica folicular (BABY & BARTLEWSKI, 2011). Também a duração da fase lútea variou em função das estações, sendo que dentro da estação reprodutiva a duração foi de 11 dias, contra 9,14 dias fora da estação. Isto demonstra que a vida do corpo lúteo é menor e que as doses de progesterona testadas, não tem efeito direto fora da estação. A maior duração do CL na estação reprodutiva pode ser explicada pelo atraso na luteólise, devido à alta concentração de progesterona circulante presente durante este período (BARTLEWSKI et al., 2004). Foi observado que tanto 60 quanto 120mg de progesterona, dentro da estação, mantiveram o corpo lúteo por tempo semelhante, porém muito diferente com as mesmas doses quando empregadas fora da estação.

Apesar dessa diferença no tempo de permanência do CL, não foi observado diferença de tamanho dos CLs dentro e fora da estação, evidenciando que a sua funcionalidade não foi afetada pelo período de atividade no ciclo estral (BABY & BARTLEWSKI, 2011). Um fato interessante foi a precocidade da observação do CL, após a ovulação, sendo que o CL na estação reprodutiva ocorreu com 4,10 dias, contrastando com os 5,75 dias, fora da estação. Essa precocidade de mais de 1,5 dias pode explicar a maior duração do CL no ciclo estral das ovelhas, dentro da estação reprodutiva. Esses dados ainda sugerem que seria possível sincronizar essas ovelhas com doses de PGF, já a partir de 4 dias após a última ovulação, possibilitando antecipar em alguns dias a realização da cobertura. Foi ainda observado que, apesar do CL emergir em dias diferentes em função das épocas avaliadas, a sua permanência perdura até os 14 dias do ciclo estral, tanto dentro como fora da estação reprodutiva. Porém, o máximo diâmetro do CL ocorreu em dias distintos, em função da estação sendo que na estação reprodutiva o diâmetro máximo foi alcançado aos 12,74 dias, enquanto fora da estação isto foi atingido aos 10,55 dias. O momento da ovulação, após a emergência do folículo ovulatório, não foi diferente estatisticamente, ocorrendo em média aos 4 dias dentro da estação e 4,5 dias, fora da estação. Foi observada uma população de folículos de vários tamanhos, com uma variedade de

combinações, o que sugere que o crescimento desses folículos não segue a lógica conhecida para outras espécies, como a bovina (MIURA, 2019). Um número superior de pequenos folículos, com diâmetro menor de 3,4 mm, foram encontrados na primeira, segunda e terceira ondas foliculares, durante a estação reprodutiva, quando comparado ao período fora da estação, demonstrando um recrutamento folicular maior, na estação reprodutiva de ovelhas leiteiras. Isto está relacionado com a maior atividade de FSH circulante no período de atividade reprodutiva (BABY & BARTLEWSKI, 2011). Já na quarta onda, os folículos médios, com tamanho entre 3,5 até 4,9mm, sofreram influência do período reprodutivo, sendo encontrados em média 2 folículos na estação reprodutiva, contra 1 folículo fora da estação. ADAMS et al. (1999), sugerem que durante o início da fase lútea e da fase folicular do ciclo estral, o maior folículo pode suprimir parcialmente o crescimento de folículos menores. Porém a emergência de uma nova onda começa antes do início da fase estática da onda anterior. Essa situação de codominância pode ocorrer em ovelhas de múltipla ovulação (Evans, 2003). Como pode ser observado na tabela 3, ocorrem algumas variações no desenvolvimento folicular entre a primeira, a segunda e a terceira ondas, dentro e fora da estação, não respeitando um comportamento padrão entre elas, o que sugere que essas ondas com folículos menores que 4mm, crescem de forma aleatória, podendo aparecer em número variado e de várias maneiras durante as ondas de crescimento folicular. Quando avaliada a quarta onda, responsável pelo folículo ovulatório daquele ciclo, observou-se que o dia da emergência do folículo ovulatório ocorreu mais próximo ao final do ciclo estral, dentro da estação. Isto possibilita que esse ócito seja de melhor qualidade, por não estar envelhecido (SEEKALLU et al., 2010; BARTLEWSKI et al., 2017). Esse folículo, mesmo tendo emergido depois, alcança um maior diâmetro, em função de sua maior taxa de crescimento diário e menor duração da fase estática, do que as mesmas avaliações ocorridas fora da estação. Isto determina que folículos ovulatórios na estação reprodutiva, apresentam uma maior viabilidade que aqueles ovulados fora da estação.

## 6.6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram caracterizar a dinâmica folicular em ovelhas leiteiras, demonstrando que existem diferenças no seu desenvolvimento em função de ocorrer dentro ou fora da estação reprodutiva. Fora da estação, as ovelhas encontram-se em anestro e após serem protocoladas o diâmetro do folículo ovulatório é menor, assim como o número de ovulações. A elucidação da variação existente na dinâmica folicular em ovelhas leiteiras possibilita a formulação de protocolos de inseminação/cobertura em tempo fixo, adequados

ao momento de sua utilização, aumentando as chances de parições constantes ao longo do ano que, por consequência, resulta em produção de leite homogênea ao longo do tempo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **JReprod Fertil Suppl**, Canadá, v. 54, p. 17-32, 1999.
- BABY T.E.; BARTLEWSKI, P.M. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. **Reprod Fertil Dev**, Canadá, v. 23, p. 303–10, 2011.
- BAIRD, D.T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. **J. Reprod. Fertil**, Escócia, v. 69, p. 343-352, 1983.
- BARTLEWSKI P.M.; ARAVINDAKSHAN, J.; BEARD A.P.; NELSON, M. L.; BATIASTA-ARTEAGA, S.; COOK, J.; et al. Effects of medroxyproge testosterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes. **Anim Reprod Sci**, Canadá, v. 81, p. 63–75, 2004.
- BARTLEWSKI, P. M.; SOHAL, J.; PARAVINJA, V.; BEBÉ, T.; OLIVEIRA, M. E. F.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; ZIEBA, D. A.; KEISLER, D. H. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in shee. **Domestic Animal Endocrinology**, Canadá, v. 58, p. 30- 38, 2017.
- BROGNI, C. F. & SOUZA, A. F. D. E. Ultrassonografia em Dinâmica Folicular Ovina. **Open Journal of Agricultural Research**, Brasil, v. 1 n. 1, p. 25–29, 2021.
- CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**, Reino Unido, v. 49, p. 335-350, 1995.
- EVANS A. C. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Anim Reprod Sci**, Irlanda, v. 78, p. 289-306, 2003.
- 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. **Anim. Reprod. Sci**, Espanha, v. 65, p. 265-272, 2001.
- GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A. Ovarian follicular dynamics and dominance effect in sheep. Societa Italiana di fisiologia Veterinaria. **VI congress Nazionale**. Stointino (Sassari), Italy, Guigo, p.2–4, 2005.
- GOODMAN, R. L. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.; **The physiology of reproduction**. ew York: Raven Press Ltd., p. 659-709 1994.
- HUTCHINSON, J. S. M. & ROBERTSON, H. A. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. **Res. vet. Sci**, Escócia, v. 7, p. 17, 1966.

LAMBERSON, W. R.; THOMAS, D. L. Effects of season and breed of sire on incidence of estrus and ovulation rate in sheep. **Journal of animal science**, Corvallis-Estados Unidos, v. 54, n. 3, p. 533-9, 1982.

LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. **Theriogenology** Uruguay, v. 52, p. 505-514, 1999.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development**, Uruguay, v. 22, n. 1, p. 113-8, 2010.

MIURA R. Physiological characteristics and effects on fertility of the first follicular wave dominant follicle in cattle. **J Reprod Dev**, Japão, v. 65, n. 4 p. 289-295, 2019.

Noël, B.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. **Journal of reproduction and fertility**, Bélgica, v. 99, n. 2, p. 695-700, 1993.

OLIVEIRA, M.E.F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. **Acta Scientiae Veterinariae**, Brasil, v. 39, p. 65-70, 2011.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2alpha. **Anim Reprod Sci**, Uruguay, v. 78, p. 47-55, 2003a.

RUBIANES, E.; DE CASTRO, T.; CARVAJAL, B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonographically monitored ewes. **Can. J. Anim. Sci**, Uruguay, v.76, p. 473-475, 1996.

SEEKALLU, S.V.; TOOSI, B.M.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.W.; DAVIES, K.L.; WALDNER, C.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. **Theriogenology**, Uruguay, v. 73, p. 670–680, 2010.

SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **J Reprod Fertil**, Reino Unido, v. 108, p. 101-106, 1996.

TALAFHA, A. Q.; ABABNEH, M.M. Awassi sheep reproduction and milk production: Review. **Trop Anim Health Prod**, Jordânia, v. 43, p. 1319–1326, 2011.

## **7 ARTIGO 2 – A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA E A ESTAÇÃO REPRODUTIVA INTERFEREM NA DINÂMICA FOLICULAR E NA FERTILIDADE DE OVELHAS LEITEIRAS.**

### 7.1 RESUMO

**Background:** High concentration of exogenous progesterone interferes with follicular development by decreasing LH secretion that is responsible for maintaining dominant follicles in the ovary. Follicular turnover during the estrous cycle is also characterized by the action of elevated concentration of progesterone. The improvement in knowledge of ovarian physiology supports the use of short-term protocols (5-7 days) instead of long protocols (12-14 days), and in short protocols, the use of high-dose progesterone is more effective in inducing estrus and ovulation. However, there are no data evaluating these conditions in dairy ewes. This study evaluated the follicular dynamics of dairy ewes inside and outside the breeding season, during the permanence (6 days) of the vaginal pessary containing high (120mg) and low (60mg) dose of progesterone.

**Materials, Methods & Results:** The experiment was performed in the breeding season (April/May) and out of season (October/November), evaluating the ovarian dynamic response with the use of vaginal pessaries containing 60 or 120mg of progesterone, during six days. At pessaries removal 75 µg de cloprostenol de sódio and 400IU of ECG were applied. The ram exposure was performed 50 hours later. It was observed that the ovulatory follicle has a larger diameter (5.95mm) in the season against 4.98mm out of season. The dominant follicle on D0 of the protocol measured 4.77mm in season against 1.55mm out of season, in addition to the absence of corpus luteum, showing seasonal anestrus. The time of ovulation occurred around 48.68h after the pessaries removal in the season and after 53.40h out of the season. The CL size was larger in the breeding season, with 12.15mm against 11.45 out of season. The conception rate was 71.4% in season and 50% out of the season. With 60mg pessaries, 41.2% of conception was achieved out of season, while with 120mg this rate increased to 58.8%. The number of live-born lambs/ewe was 2.32 in the season and 1.59 out of the season.

**Discussion:** Reproductive seasonality is an important factor also for dairy ewes. Outside the breeding season, females were in anestrus, with only small follicles and absence of corpus luteum. In season, ovulatory follicle emergence was precocious, occurring at 3.79 days after progesterone device removal, against 4.02 days observed out of the season. This possibly is due to the addition of progesterone from device associated with the production of CL, during the season. The average period of ovulation occurred around 48.68 hours in the season, and at 53.40

hours outside the season. This variation in ewes has already been described, but this is the first report in dairy ewes. The number of ovulations differed between the seasons and between the progesterone doses, suggesting a direct effect of progesterone doses and the season. The conception rate in the breeding season was higher, since the ovarian activity and the presence of a CL on D0, improve the response of the female to the protocol, and even allowed a largest size of the CL at 30 days of gestation. In the off season, the 120mg progesterone protocol provided a higher conception rate, possibly by better preparing the ovulatory wave of the cycle, and thus providing an opportunity for the release of an oocyte with greater viability.

**Key-words:** Ovulation, Follicular waves, Ultrasonography, Reproductive season, Progesterone pessaries, seasonal anestrus.

## 7.2 INTRODUÇÃO

O advento da ultrassonografia ovariana na década de 1990 (SCHRICK et al., 1993) permitiu a caracterização do *turnover* folicular durante o ciclo estral (EVANS, 2003) e demonstrou o sucesso dos tratamentos curtos. Em estudos usando CIDR® (MENCHACA et al., 2018; RUBIANES 2004), a triagem dos efeitos da progesterona exógena no crescimento folicular mostrou que a concentração elevada de progesterona no sangue obtida com a inserção do dispositivo diminuiu a secreção de LH. Após a inserção do CIDR® ocorre a redução na disponibilidade de LH, que é o hormônio que sustenta os folículos dominantes (CAMPBELL et al., 1995), causando atresia dos grandes folículos presentes nos ovários, levando ao aparecimento de novos folículos pré-ovulatórios que atingem seu diâmetro máximo após 5 a 7 dias da inserção do CIDR®. Assim, a remoção do progestágeno nesse período garantiria a presença de um folículo pré-ovulatório em crescimento saudável, capaz de induzir o estro e obter uma ovulação fértil (MENCHACA et al., 2018).

O aprimoramento do conhecimento da fisiologia ovariana e da dinâmica folicular suporta o uso de protocolos de curta duração (5-7 dias) ao invés de protocolos longos de (12-14 dias). Nos protocolos de curta duração a utilização de progesterona em altas doses tem se mostrado mais eficiente para induzir o estro e a ovulação. Não se sabe ainda se a dinâmica folicular em ovelhas leiteiras é diferente dentro da estação quando comparado com o período não ativo de reprodução ovina. Por conta disso, é importante avaliar um protocolo curto, com dose ajustável de progesterona, para ser utilizado em cada estação. Assim, esse trabalho teve por objetivos avaliar o uso de alta e baixa dose de progesterona exógena, em ovelhas leiteiras



dentro e fora da estação reprodutiva, avaliando a dinâmica folicular, as taxas de prenhez e o número de cordeiros nascidos.

### 7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido dentro da estação reprodutiva nos meses de abril/maio e fora da estação em outubro/novembro, para determinar o comportamento folicular em cada estação durante a permanência do dispositivo.

#### 7.3.1 Seleção dos animais

Foram utilizadas fêmeas ovinas leiteiras, predominantemente da raça Lacaune, multíparas, híginas, adultas em idade reprodutiva, em ótimo escore corporal, classificadas como 3 em uma escala de 1 a 5, sendo 1 animal extremamente magro e 5 obeso. Os animais recebiam concentrado a base de milho, soja e núcleo mineral à 0,5% do PV, mais sal mineral para ovinos à vontade, além de pastejo de *Pennisetum clandestinum Hochst* (Capim-quicuí) e de *Cynodon spp* (Tifton-85) e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em Lages/SC com latitude 27° 48' 58" S e longitude 50° 19' 34" W. Esse trabalho foi aprovado junto ao comitê de ética do CAV-UDESC o número 8167261118.

#### 7.3.2 Avaliação ultrassonográfica

Para o exame, as fêmeas foram manejadas em posição quadrupedal ou em leve elevação, com a parede abdominal comprimida (BROGNI & SOUZA, 2021). O equipamento de ultrassom (Mindray/DP50) foi utilizado em modo-B tempo real, com transdutor linear retal com frequências variando entre 6 e 8,5MHz, acoplado a um tubo de plástico ligeiramente curvado (medindo 30 cm de comprimento), permitindo a manipulação externa. Inicialmente procedia-se a remoção das fezes do reto, seguido da deposição de 5 a 10mL de gel no conduto retal e sobre o transdutor. As ovelhas foram submetidas ao acompanhamento ultrassonográfico diário desde a colocação do dispositivo contendo progesterona até a ovulação. No momento da retirada dos pessários foi aplicado prostaglandina (75 µg de cloprostenol de sódio) e gonadotrofina coriônica equina eCG (400UI). A ocorrência da ovulação foi definida pela ausência do folículo dominante detectado nos exames ultrassonográfico anteriores, caracterizando então o início do ciclo estral.

### **7.3.3 Manipulação do ciclo estral**

Nesta etapa foram utilizadas 40 fêmeas multíparas, divididas em dois grupos de 10 animais em cada estação, sendo dois grupos avaliados nos meses de outubro-novembro (fora da estação) e os outros dois grupos avaliados em abril-maio (dentro da estação). As fêmeas foram submetidas a protocolos de manipulação de ciclo estral com o uso de pessários vaginais contendo progesterona em alta (120mg) e baixa (60mg) concentração, com o dispositivo permanecendo por um período de seis dias. No momento da retirada do pessário vaginal foi aplicado prostaglandina (75 µg de cloprostenol de sódio) e gonadotrofina coriônica equina eCG (400UI). As avaliações da dinâmica folicular (parâmetros foliculares, luteais e ovulatórios) foram avaliadas desde o momento da inserção do dispositivo de progesterona até a ovulação, após a retirada do mesmo.

### **7.3.4 Taxa de Concepção**

Foram utilizadas 35 e 34 fêmeas em idade reprodutiva, divididas em grupos homogêneos, dentro e fora da estação reprodutiva respectivamente, sendo que dentro de cada estação se dividiu as ovelhas em dois grupos, um com 60mg e outro com 120mg de progesterona, e o encarneamento feito com aproximadamente 50 horas após a retirada dos implantes. Nesse experimento foi avaliado a taxa de concepção dos diferentes protocolos, utilizando monta controlada através de um carneiro com fertilidade conhecida. A confirmação da gestação foi realizada pelo exame ultrassonográfico transretal, realizado aos 30 dias após a cobertura, bem como o tamanho do corpo lúteo nesse momento, e ao nascimento feito a contagem do número de cordeiros nascidos vivos

### **7.3.5 Análise Estatística dos Dados**

Os dados qualitativos (taxa de concepção e número de cordeiros) foram submetidos ao teste Qui Quadrado e os demais dados submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS®. Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O modelo estatístico usado incluiu como variáveis explanatórias o efeito da estação, da concentração de progesterona e da interação entre esses.

## 7.4 RESULTADOS

O desenvolvimento folicular, bem como a dinâmica desse desenvolvimento, dentro e fora da estação e sua correlação com as doses de 60 e 120mg de progesterona nos períodos avaliados, estão sumarizados na tabela 4. Quando comparado de forma isolada apenas a época do ano, observa-se que o diâmetro do FD no dia zero-D0 (colocação do implante) foi de 4,77mm dentro da estação e 1,55mm fora da estação, evidenciando um anestro sazonal fora da estação.

O tempo para atresia completa do FD levou 3,79 dias dentro contra 4,81 fora da estação, ou seja, dentro da estação após colocação do implante a regressão desse folículo é mais rápida. Para taxa de regressão mm/dia do FD obteve-se 1,35 dentro e 1,05 fora da estação, ou seja, dentro da estação tem uma taxa de regressão maior quando comparada com fora da estação. Em relação ao dia da emergência do novo folículo dominante, foi encontrado 3,79 dias dentro contra 4,02 dias fora da estação, demonstrando que dentro da estação o folículo dominante emerge mais precocemente do que aquele fora da estação. O diâmetro do folículo ovulatório é maior dentro da estação, 5,95mm contra 4,98mm fora da estação.

Para número de ovulações, houve diferença estatística entre os períodos e grupos avaliados. Para dentro da estação se observou 2,10 ovulações quanto que fora da estação se observou 1,60 ovulações. Quando avaliado dentro da mesma estação diferentes doses, houve diferença estatística quanto ao número de ovulações fora da estação para 60mg com 1,40 ovulações e com 120mg 1,80 ovulações. Já dentro da estação foi observado com 60mg 2,05 ovulações e 2,15 ovulações com 120mg, não havendo diferença estatística nesse período da estação reprodutiva, independente da dose utilizada. Quando se avaliou o tempo de ovulação em horas, após a retirada dos implantes, foi observado que essa ovulação ocorreu com 48,68 horas dentro da estação, e com 53,40 horas fora da estação.

Quando os dados foram separados em função das doses de progesterona (60 e 120mg), dentro e fora da estação, foram observadas algumas diferenças em cada situação. Para diâmetro do FD no dia zero não há diferença entre doses na mesma estação, somente entre estações conforme já descrito acima. A atresia do FD, com a dose de 120mg dentro da estação, ocorreu aos 3,11 dias após o implante de progesterona, enquanto na dose de 60mg dentro da estação, a atresia ocorreu aos 4,4 dias. Os grupos 60mg dentro da estação (4,40), 60mg fora (4,87) e 120mg fora da estação (4,75) não diferiram entre si, sendo que o grupo 120mg dentro da estação apresentou o menor tempo (3,11 dias) diferindo de todos os demais grupos. Para taxa de regressão mm/dia, é observado uma diferença no grupo 120mg dentro da estação com 1,74mm/dia, quando comparado com os demais grupos, 60mg dentro e fora da estação e 120

fora da estação, sendo esses semelhantes entre si. Para o dia de emergência do novo folículo dominante, os grupos com 120mg dentro (3,44) e fora (3,68) da estação foram semelhantes entre si, e mais precoces do que os grupos 60mg dentro (4,10) e 60mg fora (4,36), sendo esses últimos semelhantes entre si. Em relação ao diâmetro do folículo ovulatório, não houve diferença entre as doses de progesterona dentro da estação 60mg (5,70) e 120mg (6,10), e também não houve diferença entre as doses fora da estação 60mg (4,99) e 120mg (4,98). Entretanto, houve diferença no diâmetro do folículo ovulatório em função da estação, com maior diâmetro observado dentro da estação, conforme já descrito anteriormente. E por fim, o momento da ovulação, determinado em horas, após a retirada do implante, foi de 47,60h para 60mg e 49,00h para 120mg dentro da estação e 55,20h para 60mg e 51,06h para 120mg.

Na taxa de concepção dentro da estação reprodutiva se alcançou um valor muito maior, 71,4% (25/35) contra 50% (17/34). E quando avaliado as diferentes doses em uma mesma estação, se encontrou que fora da estação com 60mg, 41,2% (7/17) contra 58,8% (10/17) com 120mg. E para número de cordeiros nascidos por fêmea se encontrou um número maior dentro da estação 2,32 (58/35) contra 1,59 (27/17) fora da estação. E para tamanho de corpo lúteo aos 30 dias se observou um CL maior com diferença entre as estações e entre as doses, estando sumarizados na tabla 5.

Tabela 4- Valores médios  $\pm$  D.P. diâmetro do FD no D0, atresia completa do FD em dias, taxa de regressão em mm/dia do FD, dia de emergência de um novo FD, diâmetro do FO, número de ovulações, e horas para ovulação após a retirada dos implantes de acordo com os grupos (60 e 120mg) e épocas do ano (dentro e fora da estação), em ovelhas leiteiras. Ciclo durante a permanência do implante.

| Agrupamento | Ø do FD no D0                | Atresia completa FD (dias)   | Taxa regressão do FD mm/dia  | Dia da emergência do novo FD | Ø do FO                      | Nº de Ovulações              | Ovulação após a retirada do implante (horas) |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
| DENTRO 60   | 4,30 $\pm$ 0,80 <sup>A</sup> | 4,40 $\pm$ 0,98 <sup>A</sup> | 1,01 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup> | 4,10 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup> | 5,70 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup> | 2,05 $\pm$ 0,22 <sup>A</sup> | 47,60 $\pm$ 2,14 <sup>B</sup>                |
| DENTRO 120  | 5,20 $\pm$ 0,49 <sup>A</sup> | 3,11 $\pm$ 0,48 <sup>B</sup> | 1,74 $\pm$ 0,36 <sup>A</sup> | 3,44 $\pm$ 0,35 <sup>B</sup> | 6,10 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup> | 2,15 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup> | 49,00 $\pm$ 2,15 <sup>B</sup>                |
| FORA 60     | 1,40 $\pm$ 0,77 <sup>B</sup> | 4,87 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup> | 1,10 $\pm$ 0,19 <sup>B</sup> | 4,36 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup> | 4,99 $\pm$ 0,12 <sup>B</sup> | 1,40 $\pm$ 0,25 <sup>B</sup> | 55,20 $\pm$ 2,25 <sup>A</sup>                |
| FORA 120    | 1,70 $\pm$ 0,63 <sup>B</sup> | 4,75 $\pm$ 0,37 <sup>A</sup> | 1,09 $\pm$ 0,11 <sup>B</sup> | 3,68 $\pm$ 0,31 <sup>B</sup> | 4,98 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup> | 1,80 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup> | 51,06 $\pm$ 2,15 <sup>A</sup>                |
| DENTRO      | 4,77 $\pm$ 0,44 <sup>A</sup> | 3,79 $\pm$ 0,40 <sup>B</sup> | 1,35 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup> | 3,79 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup> | 5,95 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup> | 2,10 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup> | 48,68 $\pm$ 2,14 <sup>B</sup>                |
| FORA        | 1,55 $\pm$ 0,44 <sup>B</sup> | 4,81 $\pm$ 0,48 <sup>A</sup> | 1,05 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup> | 4,02 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup> | 4,98 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup> | 1,60 $\pm$ 0,28 <sup>B</sup> | 53,40 $\pm$ 2,14 <sup>A</sup>                |

<sup>AB</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatísticas quando comparadas entre colunas de mesmo agrupamento (P<0,05).

Tabela 5- Taxa de concepção de ovelhas leiteiras, utilizando protocolo curto de 6 dias com 60 e 120mg de progesterona dentro e fora da estação reprodutiva, em relação a taxa de concepção, tamanho do CL e ao número de cordeiros nascidos vivos/fêmea.

| Período                   | Taxa de Concepção          | Tamanho de CL(mm)  | Número de cordeiros/fêmea |
|---------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------|
| 60mg – DENTRO DA ESTAÇÃO  | 72,2% (13/18) <sup>A</sup> | 12 <sup>A</sup>    | 2,3 (31/13) <sup>A</sup>  |
| 120mg – DENTRO DA ESTAÇÃO | 70,6% (12/17) <sup>A</sup> | 12,7 <sup>B</sup>  | 2,2 (27/12) <sup>A</sup>  |
| TOTAL                     | 71,4% (25/35) <sup>X</sup> | 12,15 <sup>X</sup> | 2,32 (58/25) <sup>X</sup> |
| 60mg – FORA DA ESTAÇÃO    | 41,2% (7/17) <sup>C</sup>  | 11,1 <sup>C</sup>  | 1,43 (10/7) <sup>C</sup>  |
| 120mg – FORA DA ESTAÇÃO   | 58,8% (10/17) <sup>D</sup> | 11,8 <sup>D</sup>  | 1,7 (17/10) <sup>D</sup>  |
| TOTAL                     | 50% (17/34) <sup>Y</sup>   | 11,45 <sup>Y</sup> | 1,59 (27/17) <sup>Y</sup> |

<sup>ABCDXY</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatísticas quando comparadas na mesma coluna dentro de cada estação (P<0,05).

## 7.5 DISCUSSÃO

O entendimento da dinâmica folicular avaliada durante a permanência do dispositivo de progesterona é de suma importância para a adequação de protocolos de sincronização de cio, bem como o entendimento do comportamento ovariano para manipulações hormonais exógenas, já que a sazonalidade na reprodução de ovinos é um fator marcante (MANCA et al., 2014). Este fato também foi encontrado em nosso estudo no qual foi observado que fora da estação os animais estavam em anestro, uma vez que foi observado apenas pequenos folículos sem a presença de corpo lúteo. Já no período da estação reprodutiva, foram encontrados folículos com 4,77 mm de tamanho e presença de CL, o que indica atividade reprodutiva.

A atresia completa do folículo de maior diâmetro no D0 ocorreu aos 3,79 dias dentro da estação contra 4,81 dias fora da estação, o que sugere que essa demora em quase 1 dia para regressir totalmente o FD e iniciar o crescimento de uma nova onda folicular, pode estar associada ao período de anestro sazonal (MANCA et al., 2014; BARTLEWSKI et al., 1999). Da mesma forma, a taxa de regressão foi diferente entre os períodos avaliados, sendo maior no FD dentro da estação (1,35mm/dia) contra 1,05mm/dia, fora da estação, corroborando com os dados anteriores. O protocolo utilizado dentro da estação fez com o que o FO emergisse aos 3,79 dias após a colocação do dispositivo dentro da estação e aos 4,02 dias fora da estação. A possível explicação disto é o somatório da sensibilização da progesterona do dispositivo, associada à progesterona proveniente do CL, já presente nessas ovelhas em atividade reprodutiva, e que não foi observado com os animais fora da estação.

Nesse estudo foi possível observar que a utilização de uma maior dose de progesterona (120mg) dentro da estação, possibilitou que o folículo dominante presente do dia de colocação do dispositivo(D0), regressisse em 3,1 dias. Isto possibilita inferir que com a concentração alta de progesterona, o protocolo curto até então executado com 6 dias de permanência do dispositivo de progesterona, (BARTLEWSKI et al., 2004), poderia ser reduzido para 4 dias, sendo necessários mais estudos, uma vez que isso seria muito interessante, diminuindo o período de cada protocolo e possibilitando uma melhor adequação da estação de monta.

Da mesma forma, a taxa de regressão mm/dia foi muito superior nesse grupo de 120mg dentro da estação, com valor de 1,74 mm/dia, enquanto nos demais grupos dentro e fora da estação, esse valor foi de 1mm/dia. Tanto dentro quanto fora da estação utilizando 120mg de progesterona, foi encontrado valores semelhantes para o dia da emergência do folículo ovulatório, 3,44 dias dentro da estação e 3,68 dias fora da estação, após a colocação do implante de progesterona. Esse fato pode ser explicado pela elevação da p4 circulante (BABY &

BARTLEWSKI, 2011).

O diâmetro do folículo ovulatório dentro da estação foi próximo a 6mm, superior aos observados fora da estação, os quais se aproximaram de 5mm, ambos menores aos das ovelhas da raça Santa Inês que na estação reprodutiva esses diâmetros próximos a 7mm (Oliveira, 2016).

O período médio de ovulação aconteceu em torno de 48,68 horas dentro da estação, enquanto que fora da estação esse valor foi de 53,40 dias, determinando uma variação média de 5 horas entre um grupo e outro. A variação no período de ovulação em ovinos já é descrita (CUMMING et al., 1971; LASSOUED et al., 2014), mas esse mapeamento em ovelhas leiteiras é o primeiro estudo.

O número de ovulações simples ou duplas diferiu entre as estações avaliadas e entre as doses de progesterona, o que sugere um efeito direto da dose e da estação sobre o número de ovulações, isso pode ser observado pelo número de cordeiros nascidos por fêmea, inferindo que dentro da estação se encontram um maior número de partos múltiplos do que fora da estação reprodutiva, e que fora da estação reprodutiva com 120mg se observa um maior número de cordeiros nascidos em comparação à dose de 60mg.

Na taxa de concepção, como esperando, dentro da estação reprodutiva o valor foi superior, uma vez que a atividade ovariana e a presença do CL no D0 fazem com que a fêmea responda melhor ao protocolo, fato esse que pode ser observado com o maior tamanho do CL aos 30 dias dentro da estação quando comparado com fora da estação. Porém fora da estação o protocolo que melhor teve resposta foi o com 120mg determinando que nessa categoria animal, fora da estação, a dose maior de progesterona prepara melhor a onda ovulatória de cada ciclo, oportunizando a melhor viabilidade ao oócito e por conta disso, maior taxa de concepção nesse período.

## 7.6 CONCLUSÕES

Foi possível demonstrar que ovelhas leiteiras dentro da estação reprodutiva têm a dinâmica folicular diferente daquelas fora da estação durante a permanência do pessário vaginal. O diâmetro do folículo ovulatório dentro da estação tem tamanho maior. O momento da ovulação, após a retirada dos implantes, sofre influência da estação reprodutiva, sendo que dentro da estação a ovulação ocorre mais precocemente e ainda o número de ovulações é maior fora da estação com alta concentração de progesterona, quando comparada com menor dose fora da estação. E que o número de cordeiros nascidos é maior dentro da estação com alta dose



de progesterona e que na estação reprodutiva o tamanho do corpo lúteo é maior durante a gestação.

Foi possível concluir que fora da estação reprodutiva com alta dose de progesterona se obteve um incremento considerável na taxa de concepção e no número de cordeiros nascidos o que evidencia que é possível manter uma produção constante de leite durante todo o ano, escalonado os partos em cada estação.

## REFERÊNCIAS

- BABY TE, BARTLEWSKI PM. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. **Reprod Fertil Dev**, Canadá, v. 23, p. 303–10, 2011.
- BARTLEWSKI, P. M.; ARAVINDAKSHAN, J.; BEARD, A. P.; NELSON, M. L.; BATIASTA-ARTEAGA, S.; COOK, J.; Effects of medroxyproges testosterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes. **Anim Reprod Sci**, Canadá, v. 81, p. 63–75, 2004.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. **Anim Reprod Sci**, Canadá, v. 57, p. 67-88, 1999.
- BROGNI, C. F. & SOUZA, A. F. D. E. Ultrassonografia em Dinâmica Folicular Ovina. **Open Journal of Agricultural Research**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 25–29, 2021.
- CAMPBELL, B.K., SCARAMUZZI, R.J., WEBB, R. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**, Reino Unido, v. 49, p. 335-350, 1995.
- CUMMING, I. A.; BROWN, J. M.; BLOCKKEY, M. A.; GODING, J. R. Regulation of oestrous cycle in the ewe. **Journal Reproduction Fertility**, Austrália, v. 24, n. 1, p. 148-159, 1971.
- EVANS, A. C. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Anim Reprod Sci**, Irlanda, v. 78, p. 289-306, 2003.
- LASSOUED, N.; REKIK, M.; KHENISSI, S.; MERAI, U. M. A. Seasonality of oestrus, ovulation and ovulation rate of Sicilo-Sarde sheep. **J. Anim. Fisiologia Anim. Nutrição**, Tunisia, v. 98, n. 4, p. 686-692, 2014.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, Uruguai, v. 16, n. 1, p. 403-413, 2004.
- MENCHACA, A.; DOS SANTOS-NETO, P. C.; CUADRO, F.; SOUZA-NEVES, M.; CRISPO, M. From reproductive technologies to genome editing in small ruminants: **an embryo's journey. anim. Reproduce**, Uruguai, v.15, p. 984-995, 2018.
- MANCA, M. E; MANUNTA, M. L.; SPEZZIGU, A. Melatonin deprivation modifies follicular and corpus luteal growth dynamics in a sheep model. **Reproduction**, Espanha, v. 147, p. 885–95, 2014.
- OLIVEIRA, M. E. F.; AYRES, H.; OLIVEIRA, L. G.; OBA, E.; KRIDL, R. T.; BARTLEWSKI, P. M.; VICENTE, W. R. R. Follicular wave emergence in Santa Inês ewes subjected to long-term, progesterone-based estrous synchronization protocols at different times of the year. **Animal Reproduction Science**, Brasil, v. 174, p. 80–86, 2016.

SCHRICK, F. N.; SURFACE, R. A.; PRITCHARD, J. Y.; DAILEY, R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of reproduction**, Estados Unidos, v. 49, n. 5, p. 1133-1140, 1993.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ovelhas leiteiras apresentam um comportamento reprodutivo influenciado pela sazonalidade. Em condições naturais, a maioria das ovelhas leiteira apresentam-se em anestro, fora da estação reprodutiva. Entretanto, estas fêmeas respondem bem ao estímulo dos protocolos de indução e sincronização deaios, mesmo fora da estação reprodutiva. Ovelhas leiteiras apresentam um padrão de crescimento folicular com muitas particularidades dentro e fora da estação reprodutiva. Esse estudo possibilitou o entendimento dos acontecimentos em cada momento do ciclo estral dentro e fora da estação reprodutiva.

Com base no que foi analisado nesse trabalho é possível sugerir um protocolo para dentro da estação com o uso de 60mg de progesterona em protocolo padrão de seis dias, ajustando o momento da inseminação/cobertura em tempo fixo com 48 horas após a retirada do pessário intravaginal. Já fora da estação, a dose de progesterona recomendada é 120mg, porém com inseminação/cobertura em tempo fixo com 53 horas após a retirada do pessário intravaginal, podendo desta forma melhorar ainda mais os índices reprodutivos.

Os resultados apresentados com este trabalho podem incrementar os índices reprodutivos de ovelhas leiteiras em regiões frias, auxiliando na técnica de indução de cio e ovulação com protocolos pré-determinados, aumentando assim a eficiência reprodutiva do rebanho de ovelhas leiteiras ajustando os protocolos de sincronização para serem usados durante todo o ano.