

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

TESE

**Produção e Coleta de Embriões pelo Método Não
Cirúrgico em Ovelhas Morada Nova**

Aline Matos Arrais

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO E COLETA DE EMBRIÕES PELO MÉTODO NÃO
CIRÚRGICO EM OVELHAS MORADA NOVA**

ALINE MATOS ARRAIS

Sob a Orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

e Coorientação do Pesquisador
Jeferson Ferreira da Fonseca

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Ciências**,
no Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, Área de Concentração em
Ciência Clínicas.

Seropédica, RJ
Junho de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A773p Arrais , Aline Matos , 1990-
Produção e Coleta de Embriões pelo Método Não
Cirúrgico em Ovelhas Morada Nova / Aline Matos
Arrais . - Seropédica , 2021.
86 f.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
Coorientador: Jeferson Ferreira da Fonseca .
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, 2021.

1. ovelhas. 2. transcervical. 3. superovulação . 4.
embriões. 5. germoplasma. I. Mello, Marco Roberto
Bourg de, 1971-, orient. II. Fonseca , Jeferson
Ferreira da, 1972-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO
DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

ALINE MATOS ARRAIS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Patologia**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 28/06/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO, Dr., UFRRJ
(Orientador)

JOANNA MARIA GONÇALVES DE SOUZA-FABJAN, Dr., UFF

ÂNGELO JOSÉ BURLA DIAS, Dr., UENF

JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA, Dr., CESVA

RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA, Dr., UFRRJ

VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS, Dr., UFRRJ



Emitido em 2021

TERMO Nº 1027/2021 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 27/09/2021 11:47)

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

Matrícula: 1548043

(Assinado digitalmente em 27/09/2021 12:27)

RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Matrícula: 2142739

(Assinado digitalmente em 27/09/2021 20:59)

VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

Matrícula: 1201559

(Assinado digitalmente em 03/10/2021 08:54)

JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 086.668.256-26

(Assinado digitalmente em 24/09/2021 15:15)

JOANNA MARIA GONÇALVES DE SOUZA FABJAN

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 052.531.577-27

(Assinado digitalmente em 01/11/2021 12:02)

ANGELO JOSÉ BURLA DIAS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 641.157.986-53

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:

1027, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **24/09/2021** e o código de verificação: **1db0aef6f1**

*“Dedico este trabalho aos meus pais Auvilino e Wanda...
Meus primeiros orientadores.”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas, por direcionar minhas escolhas e por me fazer sentir sua presença ainda que eu estivesse distante.

À toda minha família, em especial ao meu irmão Alison Arrais e aos meus pais Wanda Arrais e Auelino Arrais. Agradeço pelo amor incondicional, e por sempre acreditarem e investirem nos meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr Marco Roberto Bourg de Mello pela amizade, paciência e dedicação com que me tratou durante esses quatro anos de Doutorado, e ao meu coorientador Dr Jeferson Ferreira da Fonseca, que dessa mesma forma, está presente em minha vida contribuindo e se dedicando à minha formação. Obrigada, tenho sorte em tê-los nesta minha caminhada.

Às professoras Dra Joanna Souza-Fabjan e Dra Maria Emilia Oliveira, pela dedicação na realização deste trabalho, por me atenderem sempre com muito carinho e atenção, mesmo sem nenhum vínculo institucional. Muito obrigada às minhas coorientadoras de coração.

À professora Dra Rosemary Bastos e da Universidade Estadual do Norte Fluminense, por abrir as portas de seu laboratório e a me ajudar nas avaliações hormonais deste trabalho. Agradeço o carinho, disponibilidade e atenção.

Ao professor Dr Angelo José Burla Dias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pelas ligações semanais, pelo incentivo e carinho. Muito obrigada meu eterno e querido mestre.

Ao Javier Edgardo Marciel por ter me ajudado nos momentos mais difíceis, por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim. A você minha eterna gratidão.

A todos da Embrapa Gado de Leite, em especial ao pesquisador Dr. Paulo Rosa, pelo apoio e incentivo, ao funcionário Geovane Souza pela amizade, e ao funcionário Juarez que além da amizade, se tornou minha família.

A todos da Embrapa Pecuária Sudeste, em especial ao pesquisador Dr. Sergio Esteves e a Médica Veterinária Verônica Schinaider, pela ajuda durante as fases experimentais e por todo carinho recebido. Vocês enriqueceram os meus dias.

A todos do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial aos professores Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus e Me. José Eugênio Três, pelo apoio e incentivo, aos funcionários Zico e Zezinho pelos valiosos conselhos. Agradeço todos pelo carinho.

Agradeço a todos que ajudaram no desenvolvimento deste experimento, em especial aos alunos Luana Cortês, Gisele Bonato, Gabriel Vergani, Jennifer Hauschildt, Lúcia Prellwitz, Marco Souza, Lucas Figueira. Muito obrigada, nada seria possível sem vocês.

Agradeço a todos os moradores do alojamento da Embrapa Gado de leite, em especial a amiga Deysilene Nunes pela amizade, carinho e amor. Você se tornou parte de minha família me ajudando a lidar com as saudades de casa.

A todas as moradoras do alojamento da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial a Otávia Reis e Sheila Gonçalves que me receberam de braços abertos, disponibilizando estadia em seus quartos. Muito obrigada, para mim, vocês são exemplos de altruísmo e dedicação.

Agradeço aos amigos Sérgio Soares famoso “Zé”, Rossana Virgilio minha “mundiça”, Ivana de Almeida, Leandro Miranda, Luciana Souza, Lucinéia Oliveira, Letícia Lemes. Vocês enriqueceram meus dias.

Aos amigos e professores do Colégio Agrícola Nilo Peçanha, que contribuíram muito para minha formação, em especial ao professor João Batista que sempre me incentivou a realizar o curso de Medicina Veterinária.

À Embrapa Caprinos e Ovinos (Projeto SUPEROVI - 22.13.06.026.00.00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Projeto CVZ-PPM 00201-17) pelo apoio financeiro concedido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO GERAL

ARRAIS, Aline Matos. **Produção e coleta de embriões pelo método não cirúrgico em ovelhas Morada Nova**. 2021. 75p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O objetivo do presente estudo foi viabilizar a produção e coleta de embriões pelo método não cirúrgico (NSER) em ovelhas Morada Nova, uma vez que o uso desta técnica pode contribuir para o Programa de Conservação de Recursos Genéticos desta importante raça brasileira, aumentando o número de embriões nos bancos de germoplasma. Este estudo foi realizado em duas etapas sendo que na primeira, foi comparada a produção de embriões *in vivo* de doadoras submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro e/ou superovulação. As ovelhas receberam esponjas intravaginais embebidas em 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), as quais foram mantidas por seis (G6; n = 12), nove (G9; n = 12) ou 12 (G12; n = 12) dias. Metade das ovelhas em cada grupo permaneceu sincronizada (SYNCH) enquanto a outra metade foi superovulada (SOV) com hormônio folículo estimulante suíno (pFSH). Das variáveis analisadas, houve diferença no início do estro que ocorreu 10-12 h depois ($P < 0,01$) em ovelhas G9_{SYNCH} quando comparadas a G6_{SYNCH} e G12_{SYNCH}, e a duração do estro foi 19 h maior ($P < 0,01$) em G9_{SOV} do que em G6_{SOV}. A duração média do procedimento de coleta foi de $32,6 \pm 1,3$ min. Pelo menos uma estrutura foi recuperada em 85,7% das ovelhas sincronizadas e em 87,5% das superovuladas. As taxas de recuperação de embriões viáveis também foram semelhantes ($P > 0,05$) para os grupos sincronizados e superovulados: G6 ($1,0 \pm 0,3$ e $2,5 \pm 1,5$), G9 ($1,3 \pm 0,5$ e $4,8 \pm 2,0$) e G12 ($1,0 \pm 0,3$ e $4,8 \pm 2,3$). Conclui-se que o pré-tratamento com diferentes durações de progesterona pode ser empregado em ovelhas Morada Nova, resultando em taxas de recuperação embrionária viáveis em animais sincronizados e/ou superovulados. Na segunda etapa, procurou-se correlacionar quantidade de folículos acima de 2 mm de diâmetro no momento da última dose de pFSH com a resposta superovulatória (número de corpos lúteos) e a produção de embriões (quantidade de blastocisto e qualidade embrionária) em ovelhas sincronizadas com os dois tratamentos mais promissores do experimento anterior (G9 e G12). A contagem total de folículos com diâmetro ≥ 2 mm dobrou entre a 1ª e a 6ª dose de pFSH em ambos os grupos de ovelhas ($P < 0,05$). As respostas ao estro não variaram entre os dois subconjuntos de ovelhas Morada Nova e foram em média 95,2%. Corpos lúteos (CL) foram detectados em 85,0% e 60,0% das ovelhas que apresentaram cio, respectivamente, nos grupos G9 e G12. A NSER foi concluída com sucesso em 86,2% de todas as ovelhas estudadas. O número médio de CLs por doadora e por doadora lavada com sucesso foi maior ($P < 0,05$) no G12 ($12,3 \pm 1,7$ / $12,1 \pm 1,9$) do que no G9 ($7,9 \pm 1,4$ / $8,2 \pm 1,6$). O número médio de blastocistos recuperados e de embriões viáveis foi maior ($P < 0,05$) para G12 ($5,8 \pm 1,9$ e $3,7 \pm 1,7$) do que para G9 ($3,5 \pm 1,1$ e $0,8 \pm 0,3$, respectivamente). A contagem total de folículos no momento da aplicação da 6ª dose de pFSH no grupo G12 foi positivamente correlacionada ($P < 0,05$) com o número de CLs ($r = 0,95$) e com o de embriões viáveis ($r = 0,91$). Conclui-se que o protocolo de sincronização de estro baseado na utilização de P4 por 12 dias resultou em melhores resultados superovulatórios quando comparado ao protocolo de 9 dias e que a contagem total de folículos na última dose de pFSH foi um bom preditor de resposta superovulatória apenas nas ovelhas tratadas com P4 por 12 dias.

Palavras-chave: superovulação, cérvix, progesterona, ovinos, banco de germoplasma.

GENERAL ABSTRACT

ARRAIS, Aline Matos. **Production and recovery of embryos by non-surgical method in Morada Nova ewes.** 2021. 75p. Thesis (Doctor in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The objective of the present study was to enable the production and collection of embryos by the non-surgical method (NSER) in Morada Nova ewes, since the use of this procedure can contribute to the Program for the Conservation of Genetic Resources of this important Brazilian breed, increasing the number of embryos in germplasm banks. This study was carried out in two experiments; the first one compared the production of embryos in vivo from donors submitted to different estrous and / or superovulation synchronization protocols. The ewes received intravaginal sponges soaked in 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP), which were maintained for six (G6; n = 12), nine (G9; n = 12) or 12 (G12; n = 12) days. Half of the ewes in each group remained synchronized (SYNCH) while the other half were superovulated (SOV) with porcine follicle stimulating hormone (pFSH). Of the analyzed variables, there was a difference in the beginning of estrus that occurred 10-12 h later ($P < 0.01$) in G9_{SYNCH} ewes when compared to G6_{SYNCH} and G12_{SYNCH}, and the duration of estrus was 19 h longer ($P < 0.01$) in G9_{SOV} than in G6_{SOV}. The average duration of the collection procedure was 32.6 ± 1.3 min. At least one structure was recovered in 85.7 and 87.5% of the synchronized and superovulated ewes, respectively. The recovery rates of viable embryos were also similar ($P > 0.05$) for the synchronized and superovulated groups: G6 (1.0 ± 0.3 and 2.5 ± 1.5), G9 (1.3 ± 0.5 and 4.8 ± 2.0) and G12 (1.0 ± 0.3 and 4.8 ± 2.3). It is concluded that pretreatment with different progesterone durations can be used in Morada Nova ewes, resulting in viable embryo recovery rates in synchronized and / or superovulated animals. In the second experiment, the number of follicles ≥ 2 mm at the time of the last dose of pFSH was correlate with the superovulatory response (number of corpus luteum) and the production of embryos (number of blastocyst and embryonic quality) in synchronized ewes with the two most promising treatments from the previous experiment (G9 and G12). The total count of follicles ≥ 2 mm doubled from the 1st to the 6th pFSH dose in both groups of ewes ($P < 0.05$). Estrus responses did not vary between the two subsets of Morada Nova sheep and they averaged 95.2%. Corpora lutea (CL) were detected in 85.0% and 60.0% of ewes going estrus in G9 Days and G12 Days groups, respectively. NSER was successfully completed in 86.2% of all ewes studied ($P > 0.05$). The mean number of CL per ewe/successfully flushed donor ewe was greater ($P < 0.05$) in G12 ($12.3 \pm 1.7/12.1 \pm 1.9$) than in G9 ($7.9 \pm 1.4/8.2 \pm 1.6$). Mean numbers of retrieved blastocysts and viable embryos were greater ($P > 0.05$) for G12 (5.8 ± 1.9 and 3.7 ± 1.7) than for G9 ewes (3.5 ± 1.1 and 0.8 ± 0.3 , respectively). The total follicle count when applying the 6th dose of pFSH in the G12 group was positively correlated ($P < 0.05$) with the number of CLs ($r = 0.95$) and with the number of viable embryos ($r = 0.91$). It was concluded that estrus synchronization protocol based on the use of P4 for 12 days resulted in better superovulatory results when compared to the 9 days protocol and that the total follicle count in the last dose of pFSH was a good predictor of superovulatory response only in Morada Nova ewes treated with P4 for 12 days.

Keywords: superovulation, cervix, progesterone, sheep, germplasm bank.

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Animais da raça Morada Nova variedade vermelha: ovelha com cordeiro à esquerda (Foto: Gisele Rosso) e carneiro adulto à direita (Foto: Façanha)..... 03
- Figura 2.** Representação esquemática dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar protocolos de sincronização de estro e / ou superovulação a curto (6 dias), médio (9 dias) ou longo prazo (12 dias) e para verificar a viabilidade de recuperação não cirúrgica de embriões (NSER) nas ovelhas Morada Nova. T = período da tarde; M = período da manhã; MAP = acetato de medroxiprogesterona; eCG = gonadotrofina coriônica equina; i.m. = intramuscular; i.v. = intravenosa; l.v. = latero-vulvar..... 25
- Figura 3.** Representação esquemática dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar o efeito da duração (9 ou 12 dias) do pré-tratamento com progesterona em ovelhas Morada Nova superovuladas e submetidas à recuperação não cirúrgica de embriões (NSER). T = período da tarde; M = período da manhã; P4 = dispositivo intravaginal contendo 0,36g de progesterona; eCG = gonadotrofina coriônica equina; i.m. = intramuscular; i.v. = intravenosa; l.v. = latero-vulvar; IU – unidades internacionais. 44
- Figura 4.** (A) Porcentagem de ovelhas, corpos lúteos (CL), estruturas não fertilizadas/embriões e embriões viáveis para cada classe de contagem de CL determinada por ultrassonografia em doadoras Morada Nova antes da coleta não cirúrgica de embriões (NSER). (B) Porcentagens de embriões viáveis (graus 1, 2 e 3) de doadoras Morada Nova com número superior ou inferior a 10 corpos lúteos (CL) um dia antes da NSER após serem submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro à base de progesterona (G-9 e G-12). 50
- Tabela 1.** Parâmetros (% ou média \pm SEM) relacionados à população de folículos antrais determinados por ultrassonografia 60 horas antes da remoção da esponja de MAP em ovelhas Morada Nova que foram submetidas a pré-tratamento com progesterona de curto (6 dias), médio (9 dias) ou longo prazo (12 dias)..... 29
- Tabela 2.** Variáveis analisadas (% ou média \pm EP) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolos de sincronização de estro com diferentes tempos de duração de MAP e coleta por método não cirúrgico 6 a 7 dias após o início de estro..... 30
- Tabela 3.** Variáveis analisadas (% ou média \pm EP) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolos de sincronização de estro com diferentes tempos de duração de MAP, superovulação hormonal e coleta de embriões por método não cirúrgico 6 a 7 dias após o início do estro. 31
- Tabela 4.** Variáveis analisadas (% ou média \pm EP) em ovelhas Morada Nova submetidas ao protocolo de sincronização de estro (SYNCH) ou de superovulação (SOV)..... 322
- Tabela 5.** Parâmetros (% ou média \pm SEM) relacionados à população de folículos antrais determinados por ultrassonografia no momento da 1^a (60 h antes da remoção do dispositivo) e 6^a (no momento da remoção do dispositivo) dose de pFSH em ovelhas Morada Nova que foram submetidas a pré-tratamento com progesterona por 9 (G9) ou 12 dias (G12). 48

Tabela 6. Variáveis analisadas (% ou média \pm SEM) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolo de sincronização de estro de 9 (G-9) ou 12 dias (G-12), superovulação com 133 mg de pFSH e recuperação embrionária pela técnica não cirúrgica (NSER), 6 a 7 dias após o início do estro. 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A Raça Morada Nova.....	03
2.2 Programa de Conservação de Recursos Genéticos	05
2.3 Fisiologia do Ciclo Estral em Ovelhas	06
2.4 Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE)	07
2.4.1 Indução e sincronização do ciclo estral	07
2.4.2 Superovulação de doadoras	10
2.4.3 Monta natural ou inseminação artificial das doadoras	12
2.4.4 Coleta de embriões em ovinos	13
3 CAPÍTULO I: RECUPERAÇÃO NÃO CIRÚRGICA DE EMBRIÕES DE OVELHAS MORADA NOVA APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO OU SUPEROVULAÇÃO: UMA ESTRATÉGIA VIÁVEL PARA BANCO DE EMBRIÕES OVINOS	18
3.1 Resumo	19
3.2 Abstract.....	20
3.3 Introdução	21
3.4 Material e Métodos	23
3.4.1 Condições gerais do experimento	233
3.4.2 Delineamento experimental	23
3.4.3 Avaliação ultrassonográfica dos ovários	25
3.4.4 Procedimentos para coleta de embriões pela técnica não cirúrgica (NSER).....	266
3.4.5 Variáveis e análise estatística	27
3.5 Resultados.....	29
3.6 Discussão	33
3.7 Conclusões.....	37
4 CAPÍTULO II: UM ESTUDO DOS FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO E A QUALIDADE DOS EMBRIÕES EM OVELHAS MORADA NOVA SUPEROVULADAS E SUBMETIDAS À COLETA NÃO CIRÚRGICA	38
4.1 Resumo	39
4.2 Abstract.....	40
4.3 Introdução	41
4.4 Material e Métodos	43
4.4.1 Condições gerais do experimento	43
4.4.2 Delineamento experimental	43
4.4.3 Avaliação ultrassonográfica dos ovários	45
4.4.4 Procedimentos para coleta de embriões pela técnica não cirúrgica (NSER).....	45
4.4.5 Variáveis e análise estatística	46
4.5 Resultados.....	47
4.6 Discussão	51
4.7 Conclusões.....	54
5 CONCLUSÕES GERAIS	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 ANEXO.....	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2015), atualmente existem 1542 raças de ovinos catalogadas em todo mundo. Destas raças, 160 (10,3%) foram extintas, 191 (12,3%) encontram-se em risco de extinção e para 788 (51,1%) o risco é desconhecido, pois não há dados populacionais disponíveis para tal análise. Portanto, é possível que o número de raças extintas ou em risco de extinção seja ainda maior do que os valores estimados, sobretudo para as raças não exploradas comercialmente.

Conhecidas como crioulas ou localmente adaptadas, muitos desses ovinos, mesmo e por vezes, não sendo considerados propriamente como raças, possuem fenótipos marcantes e assumem relevante papel no desenvolvimento socioeconômico local. Manejados predominantemente em condições de subsistência, esses animais são importante fonte de renda e alimento das famílias que habitam em regiões de clima e condições ambientais, normalmente, desfavoráveis. Apesar da importância destes animais para diferentes sistemas de produção, os cruzamentos indiscriminados e/ou substituição por raças comerciais, criam um alerta para risco de extinção de raças localmente adaptadas, e a necessidade em criar programas de conservação.

O Brasil é um país caracterizado por um mosaico de biomas. Um dos mais importantes e com o segundo maior contingente populacional é a Caatinga (FONSECA et al., 2019a) que cobre 735.000 km². Nesse bioma, encontram-se importantes raças ovinas localmente adaptadas, como a raça Morada Nova, uma raça de grande importância para as famílias nordestinas, mas que atualmente encontra-se em risco de extinção. Para evitar perdas genéticas, a raça foi recentemente incluída em um programa nacional de conservação, onde um dos seus principais objetivos é a formação de bancos de germoplasma.

A conservação de germoplasma na forma de embriões é considerada a maneira mais eficiente quando comparada à preservação de sêmen, oócitos ou outros materiais (MACHADO et al., 2016). Isso ocorre porque os embriões possuem uma composição genética completa (isto é, paterna e materna), permitindo a reconstrução de uma raça extinta em uma única geração, sem que sejam necessárias, antes do seu uso, de complexas técnicas de manipulação *in vitro* (FAO, 2012). Porém, a formação dos bancos e o uso dos embriões, em momento oportuno, dependem da produção, coleta e criopreservação eficiente. Há apenas três estudos reportando tentativas de coleta de embriões em ovelhas Morada Nova. Em dois deles, foi empregada a técnica cirúrgica (Laparotomia) de recuperação de embriões (LOPES-

JÚNIOR et al., 2006; BRASIL et al., 2016). A única tentativa de coleta de embriões pela via transcervical (não-cirúrgica; NSER) não foi bem sucedida (ALMEIDA et al., 2002). Isso sugere que tanto a superovulação quanto a coleta NSER necessitem de melhor desenvolvimento na raça, algo já alcançado com sucesso na raça Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a).

Um estudo sequencial em ovelhas da raça Lacaune permitiu a padronização e estabelecimento com sucesso da técnica NSER ao mesmo tempo em que identificou pontos importantes relacionados à dinâmica folicular dessas ovelhas quando submetidas a protocolos de indução de estro sincronizado e superovulação (FIGUEIRA et al, 2020a; FIGUEIRA et al, 2020b). Essa sequência poderia ser aplicada em ovelhas Morada Nova, uma vez que os estudos existentes adotaram protocolos de longa duração (14 dias) de permanência de dispositivos vaginais (LOPES-JÚNIOR et al., 2006; BRASIL et al., 2016) e a NSER ainda não foi reportada com sucesso (ALMEIDA et al., 2002).

Diante do exposto, a presente tese foi estruturada em três partes, sendo a primeira uma revisão de literatura com objetivo de embasar a metodologia utilizada nos experimentos, abordar a importância do assunto e fomentar a discussão dos resultados dos capítulos seguintes. A segunda parte está apresentada em forma de artigo científico, cujo foco foi comparar a eficiência na produção de embriões *in vivo* em ovelhas Morada Nova superovuladas e não superovuladas submetidas a protocolos curto (6d), médio (9d) ou longo (12d) de indução de estro sincronizado à base de progestágeno, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e cloprostenol. A terceira e última parte da tese, também em forma de artigo, é um experimento cujo objetivo principal foi de correlacionar a quantidade de folículos acima de 2 mm de diâmetro no momento da última dose de pFSH com a resposta superovultória (número de corpos lúteos) e a produção de embriões (quantidade de blastocisto e qualidade embrionária) empregando os dois protocolos mais promissores do estudo anterior (Capítulo I).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Raça Morada Nova

A raça Morada Nova (Figura 1) foi primeiramente descrita em 1941 pelo zootecnista Otávio Domingues, que durante uma viagem ao Nordeste em 1937 identificou que estes animais não possuíam lã, mas pelo curto e grosseiro, ao contrário de outros ovinos (DOMINGUES, 1941). Embora Domingues tenha verificado a maior frequência destes animais no estado do Ceará, no município de Morada Nova, o que motivou o nome da raça, estes animais também foram encontrados em outros locais do Nordeste (DOMINGUES, 1941; FACÓ et al., 2008). Os ovinos da raça Morada Nova são animais de pequeno porte e bem adaptados às regiões climáticas do semiárido, tornando-se uma das principais raças nativas de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil. No entanto, a despeito do crescimento que vem sendo observado no efetivo ovino brasileiro, os rebanhos dessa raça vêm reduzindo de tamanho a cada ano, sendo que muitos criadores têm optado pela criação de outras raças como a Dorper e, principalmente, a Santa Inês. Tal fato, somado aos cruzamentos indiscriminados com animais de raças exóticas, tem posto em risco a existência e a preservação deste importante genótipo (FACÓ et al., 2008).



Figura 1. Animais da raça Morada Nova variedade vermelha: ovelha com cordeiro à esquerda (Foto: Gisele Rosso) e carneiro adulto à direita (Foto: Façanha).

A origem da raça ainda não é clara, no entanto é provável que seu genótipo seja de origem africana, com contribuições de uma raça de ovinos portuguesa, a Bordaleira (LOBO et al., 2011). Entre suas principais características morfológicas destacam-se a ausência de lã, sendo classificada como uma raça deslanada, de pequeno porte (fêmeas 30-50 kg; machos 40-60 kg), com pelagem vermelha ou branca (variedades vermelha e branca) e fêmeas mochas, enquanto os machos podem apresentar chifres (ARCO, 2021).

Em relação às características produtivas, quando comparados às raças comerciais, como a Santa Inês, os animais da raça Morada Nova possuem menor ganho de peso e qualidade de carcaça. Apesar de seu rendimento ser considerado baixo, é verificado que estes animais, devido à sua adaptabilidade ao clima semiárido, são capazes de produzir carne e couro, de alta qualidade, com baixo custo de manutenção (FACÓ et al., 2008). Desta forma, quando submetidas a melhores condições de manejo, ou seja, melhor alimentação, podem aumentar seu ganho de peso. No entanto é preciso ter cuidado, pois foi verificado que o aumento excessivo de peso nestes animais pode prejudicar seu desempenho reprodutivo (LOBO et al., 2011).

As ovelhas Morada Nova, quando criadas em regiões de clima tropical, onde existe pouca variação de luminosidade, sofrem pouca influência da estacionalidade reprodutiva, podendo manifestar estro durante todo o ano (SOUSA et al., 2015). Além disso, estes animais possuem bons índices reprodutivos, sendo conhecidos por sua alta prolificidade (1,5 crias) e boa habilidade materna, características que associadas à sua capacidade de produzir no clima semiárido, fazem destes animais importantes fontes de renda e subsistência de famílias nordestinas (FACÓ et al., 2008; LOBO et al., 2011).

Apesar da importância destes animais em nossos sistemas de produção, os cruzamentos indiscriminados e a substituição por raças comerciais criaram um alerta para o risco de extinção desta importante raça brasileira. O risco de extinção de uma raça é analisado por medidas de probabilidade que avaliam a possibilidade de uma raça ser extinta dentro de um período de tempo específico (GANDINI et al., 2004). Esta análise normalmente leva em consideração informações populacionais (número de exemplares), genéticas (variabilidade) e de distribuição geográfica dos animais (FAO, 2013).

Sabe-se atualmente que a raça Morada Nova possui um número de exemplares suficientes e com variabilidade genética (LOBO et al., 2011; MCMANUS et al., 2013; MCMANUS et al., 2019). No entanto, sabendo que a maior parte dos rebanhos da raça Morada Nova se encontra no Nordeste (MCMANUS et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014), e

que a limitação geográfica torna a raça mais susceptível às possíveis catástrofes (ALDERSON, 2009), considera-se a raça Morada Nova como em risco de extinção.

2.2 Programa de Conservação de Recursos Genéticos

Desde 1980, momento em que a conservação de animais de importância produtiva foi incluída em suas pesquisas, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vem elaborando e coordenando estratégias para preservar raças em risco de extinção (ALBUQUERQUE & IANELLA, 2016). Este trabalho é realizado em parceria com outras instituições, universidades e/ou criadores e compreende ações de conservação *in situ*, em que os animais são mantidos em núcleos de conservação localizados em sua região de origem, e a conservação *ex situ*, na qual os recursos genéticos podem ser mantidos *in vivo* em núcleos de outras regiões ou *in vitro* com a formação dos bancos de germoplasma.

O núcleo de conservação *in situ* da Morada Nova, encontra-se na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizado no município de Sobral, no estado do Ceará. Este projeto teve início em 2007, após os criadores nordestinos manifestarem preocupação quanto à redução do número de exemplares da raça. Em 2019, o núcleo possuía 50 matrizes, 10 reprodutores e aproximadamente 50 cordeiros (informação verbal)¹, que mantidos em sua região de origem, podem dar continuidade ao processo adaptativo da raça.

Em relação à conservação *ex situ*, ainda que existam rebanhos da raça fora do Nordeste, não existe nenhum núcleo oficial. Desta forma, a conservação *ex situ* nesta raça é realizada apenas *in vitro* pela formação e manutenção dos bancos de germoplasma. Atualmente encontram-se no banco da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, no Distrito Federal, aproximadamente 6.729 doses de sêmen e 120 embriões da raça Morada Nova (informação verbal)¹.

A principal função de um banco de germoplasma é a possibilidade de reconstruir uma raça caso esta venha a ser totalmente extinta. Neste contexto, considera-se que a conservação de germoplasma na forma de embriões seja mais eficiente do que na forma de sêmen, óvulos ou outros tecidos. Isso ocorre, pois os embriões possuem composição genética completa, paterna e materna, o que inclui informações genéticas mitocondriais, podendo reconstruir uma raça em única geração sem perda de variabilidade genética (ENGELS & FASSIL, 1999).

¹Informação fornecida pelo curador do núcleo de conservação de ovelhas Morada Nova da Embrapa Caprinos e Ovinos, Kleibe de Moraes Silva, em outubro de 2019.

O número e/ou proporção de sêmen e embriões em um banco de germoplasma depende das estratégias de cada programa de conservação. No entanto, independente das estratégias do programa, sabe-se quanto maior a quantidade de embriões em um banco, maiores são as chances de uma reconstrução ser bem sucedida (BOETTCHER et al., 2005). Para garantir a preservação segura de uma raça em bancos de germoplasma, estima-se que 251 embriões sejam necessários (EHLING & NIEMANN, 2000). Desta forma, para garantir a reconstrução da raça Morada Nova, é preciso produzir e armazenar mais embriões.

2.3 Fisiologia do Ciclo Estral em Ovelhas

De maneira geral, o ciclo estral envolve a interação de vários sistemas, como o nervoso central, endócrino e dos órgãos reprodutivos que resultam na manifestação do estro e na ovulação. As ovelhas, quando em condições ambientais favoráveis, isto é, em condições de fotoperíodo curto e boa disponibilidade de alimentos, apresentam sucessivos ciclos estrais, que duram em média 17 dias, sendo conhecidas como poliéstricas estacionais (OLIVEIRA; TEIXEIRA; VICENTE, 2013)

Em ovelhas, o desenvolvimento dos folículos antrais segue o padrão de “onda”. Para o desenvolvimento folicular, ocorre inicialmente um aumento nas concentrações séricas de FSH, com a duração de 3 a 4 dias. Em um ciclo estral completo, as ovelhas comumente apresentam de três a quatro ondas foliculares, com intervalo de 3 a 5 dias entre uma onda e outra. Uma onda folicular é caracterizada pelo crescimento de um grupo de folículos (emergência), seguindo por um ou mais folículos que continuam a crescer (folículos dominantes), enquanto outros folículos regridem (folículos subordinadas). Aproximadamente um a três folículos antrais ovarianos emergem ou crescem de grupos de folículos (1 a 3 mm de diâmetro), chegando ao diâmetro de ≥ 5 mm antes da ovulação ou regressão (RUBIANES & MENCHACA, 2003; RAMOS & SILVA, 2018).

Com o crescimento dos folículos, há também um aumento das concentrações séricas de estradiol, principalmente ao final de desenvolvimento do maior folículo. Na onda ovulatória, há o aumento máximo na concentração de estradiol, devido aos pulsos de LH ao final da fase lútea. Sabe-se que, durante a fase folicular, o aumento nas concentrações de estradiol estimula a secreção de GnRH a partir do hipotálamo, que conseqüentemente induz o pico de LH e a ovulação, no entanto, durante a fase lútea, a progesterona bloqueia este pico, levando a regressão folicular (ABECIA et al., 2012).

Em espécies domésticas, o início e/ou fim do ciclo estral é normalmente é caracterizado pela manifestação comportamental do estro. No início do ciclo, a concentração de progesterona geralmente é indetectável, aumentando gradualmente até alcançar uma concentração máxima de 1,5 a 3ng/ mL com a completa formação do corpo lúteo. Esta concentração permanece constante entre os dias 8 e 14 em ovelhas, até que ocorra a luteólise e as concentrações rapidamente caíam para níveis muito baixos. O uso de progesterona exógena, geralmente por dispositivos intravaginais, é baseado no princípio que este hormônio irá modular a liberação de gonadotrofinas pela hipófise. O aumento na concentração de progesterona reduz a liberação de LH, que causa atresia dos folículos dependentes desta gonadotrofina e, conseqüentemente, reduz a concentração de estradiol produzida pelos folículos. Desta forma, novos folículos são recrutados começando uma nova onda de crescimento folicular (RAMOS & SILVA, 2018)

O conhecimento da fisiologia do ciclo estral permite a elaboração e/ou aprimoramento das biotécnicas reprodutivas em fêmeas de diferentes espécies. Desta mesma forma, a utilização de hormônios exógenos pode modificar o estado fisiológico de eventos envolvidos no ciclo estral, como na duração da fase lútea, número de folículos nos ovários e/ou crescimento destes até estágios pré-ovulatórios, permitindo avanço das biotécnicas.

2.4 Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE)

A técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões é a principal ferramenta para produzir e obter de embriões na espécie ovina. De maneira geral, a MOTE baseia-se nas seguintes etapas: i) indução e sincronização do estro de fêmeas doadoras e receptoras; ii) superovulação das doadoras; iii) monta natural ou inseminação artificial das doadoras; iv) lavagens uterinas para recuperação dos embriões, v) transferência a fresco para fêmeas receptoras; vi) ou criopreservação dos embriões (RAMOS & SILVA, 2018).

2.4.1 Indução e sincronização do ciclo estral

A indução de estro é definida quando o estro ocorre em condições em que normalmente não seria possível, por exemplo, durante a estação de anestro estacional. Geralmente, para indução de estro em ovinos, tem sido utilizado programa de luz, estratégia que induz o cio, mas não de forma sincronizada (FONSECA et al., 2011). A indução de estro sincronizado é aquela obtida por meio de associações hormonais que normalmente empregam gonadotrofinas, progestágenos e prostaglandinas. Ainda de acordo com os mesmos autores,

nesse caso, há também a perspectiva de sincronia ovulatória que pode ainda ser melhorada por meio da associação com outros hormônios, ditos indutores de ovulação.

Já a sincronização de estro pressupõe que vários animais estejam apresentando estro de maneira concentrada em um determinado período de tempo relativamente curto (24 a 72 horas). Isso pode ser obtido, por exemplo, encurtando-se a fase luteal por meio da administração de prostaglandinas ou seus análogos (cloprostenol) durante a estação de acasalamento natural, ou ainda utilizando o efeito macho (FONSECA et al., 2011).

Em algumas raças como Morada Nova, que aparentemente pouco influenciadas pelo fotoperíodo, a sincronização de estro pode ser realizada através da luteólise do corpo lúteo pelo uso de prostaglandina F₂α (PGF₂α) ou análogos em qualquer estação do ano. No entanto, para a produção de embriões, a utilização de dispositivos intravaginais de progesterona exógena, fornecem um método mais seguro de controlar o ciclo estral de doadoras durante, ou fora da estação reprodutiva (EVANS et al., 2004).

Entre os principais dispositivos utilizados para sincronização do estro em ovinos, encontram-se as esponjas, que contém acetato de medroxiprogesterona (MAP) e os dispositivos intravaginais de liberação controlada (CIDR - Controlled internal drug release), impregnado de progesterona (KARL, 2012). Hashemi et al. (2006) investigaram a eficiência da sincronização usando diferentes tratamentos com progesterona em ovelhas fora da estação reprodutiva. Ao compararem o uso de esponja MAP com o CIDR, associados à gonodotrofina coriônica equina (eCG), não observaram diferenças entre o início do estro ($29,6 \pm 5,6$ e $30,1 \pm 7,6$ horas, respectivamente), resposta ao estro (100% e 93,3%) ou duração ($22,1 \pm 3,4$ e $31,8 \pm 11$ h) demonstrando que os dois dispositivos são eficientes na indução e sincronização do estro.

O uso de progesterona exógena vem sendo utilizado para induzir e sincronizar o estro em ovelhas Morada Nova e Santa Inês. Rodrigues et al. (2004), ao utilizarem dispositivos de progesterona exógena durante 14 dias, associado à administração 200 UI de eCG, observaram manifestação do estro em 100% (11/11) dos animais. Gottardi et al. (2004) em outro estudo com as mesmas raças, observaram 88,2 % (45/51) de resposta ao estro, de ovelhas tratadas com dispositivos intravaginais durante 9 dias, associada a uma administração de eCG e d-cloprostenol ao término do protocolo. Neste estudo também foi observado que o estro se manifestava em até 48 horas, após a retirada dos dispositivos.

As doadoras usadas para produção *in vivo* de embriões são normalmente submetidas a tratamentos superovulatórios conduzidos em conjunto com um protocolo de sincronização de estro usando progestágenos exógenos. No entanto, há uma enorme variabilidade nas respostas ovarianas aos protocolos de sincronização de estro e ovulação em ovelhas (BARTLEWSKI et

al., 1999). No passado, alguns trabalhos tiveram como objetivo estabelecer a duração ideal do tratamento com dispositivos de liberação de progesterona para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b) e Santa Inês (OLIVEIRA et al., 2020).

Nos protocolos de sincronização do estro, comumente é utilizada a eCG, afim de estimular o crescimento folicular e a ovulação (DIAS et al., 2001). Este hormônio é usado ao final dos tratamentos com os dispositivos intravaginais de progesterona ou progestágeno, que habitualmente duram de 12 a 14 dias, simulando a duração de um corpo lúteo cíclico.

Embora com o tratamento de progesterona de longa duração seja possível sincronizar o estro e as ovulações, além de reduzir a incidência de corpos lúteos inadequados após o acasalamento, a exposição à progesterona durante longos períodos (10-18 dias) pode reduzir a fertilidade em ovelhas conforme reportado por Viñoles et al. (2001). A redução do período de exposição à progesterona é desejável porque reduz a perda de dispositivos intravaginais, bem como a ocorrência de secreções vaginais e infecções (FONSECA & TORRES, 2005). Em cabras Saanen em anestro, os tratamentos de sincronização de estro usando esponjas impregnadas de progestágeno inseridas para 6, 9 ou 12 dias produziram resultados semelhantes (PIETROSKI et al., 2013), mas tal estudo comparativo não existe para ovelhas Morada Nova.

Teixeira et al. (2016) avaliaram o efeito da duração do tratamento hormonal com esponjas de progesterona (P4) durante o anestro sazonal assim como testaram a administração de duas doses de prostaglandina com 7 dias de intervalo durante a estação reprodutiva sobre os parâmetros reprodutivos em ovelhas Santa Inês. Os autores concluíram que o uso de dispositivo de P4 durante 9 dias promoveu menor dispersão da ovulação quando comparado ao seu uso por 6 ou 12 dias, e o protocolo de duas doses de prostaglandina com 7 dias de intervalo sincronizou o estro de forma eficiente.

Balaro et al. (2016) testaram a capacidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em sincronizar a ovulação e a emergência de uma nova onda folicular antes de um protocolo de superovulação em ovelhas Santa Inês. Os autores observaram que o uso do agonista de GnRH, 36 horas após a remoção da esponja, sincronizou a ovulação de forma mais eficiente e promoveu a ausência de folículos dominantes durante o diestro inicial podendo ser utilizado com sucesso no início do tratamento superovulatório em ovelhas Santa Inês.

Souza-Fabjan et al. (2017) compararam diferentes tratamentos hormonais para induzir e sincronizar a emergência de ondas foliculares no sentido de melhorar os resultados de

tratamentos superovulatórios em ovelhas Santa Inês. Os autores sincronizaram as fêmeas com quatro diferentes tratamentos: dispositivo intravaginal de progesterona (P4) mais um análogo de PGF2 α (grupo GP4); ou com o mesmo tratamento anterior acrescido de benzoato de estradiol (GP4 + EB) ou com um agonista GnRH (GP4 + GnRH), ou ainda com ambos, benzoato de estradiol e um agonista GnRH (GP4 + EB + GnRH) em um delineamento fatorial 2X2. Os autores não observaram diferença entre os tratamentos e concluíram que o uso de dispositivos de P4 associados ao cloprostenol parece ser adequado para sincronizar a emergência folicular em ovelhas Santa Inês sem qualquer benefício da adição de agonistas de GnRH ou de benzoato de estradiol.

Martinez et al. (2015) estudaram o efeito de um protocolo hormonal para induzir o estro e a ovulação fora da estação reprodutiva em ovelhas Romney Marsh. O protocolo consistiu em um tratamento de 7 dias com um dispositivo de liberação de progesterona intravaginal (IPRD) e administração de GnRH no momento da inserção do dispositivo (Dia 0) e gonadotrofina coriônica equina (eCG) e prostaglandina F2 α na remoção de IPRD (Dia 7). Os autores concluíram que este tratamento foi eficiente fora da estação reprodutiva, promovendo a indução de estro (77,8%) e de ovulação (88,9%) em uma alta proporção de ovelhas. Também foram observadas altas taxas de prenhez após monta natural (68,8%), com uma baixa incidência de trigêmeos.

2.4.2 Superovulação de doadoras

Para promover a superovulação das doadoras comumente são utilizadas administrações diárias de eCG ou de hormônio folículo-estimulante suíno (pFSH). No entanto, o pFSH vem sendo mais amplamente utilizado, uma vez que a eCG em dosagens altas pode gerar folículos anovulatórios (ARMSTRONG & EVANS, 1983).

Luna-Palomera et al. (2019) avaliaram o efeito tratamento conjunto do hormônio folículo-estimulante (FSH) e da eCG sobre as concentrações de insulina sérica e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), resposta superovulatória, taxa ovulatória e número e produção de embriões em ovelhas da raça Katahdin durante a estação não reprodutiva. Os resultados gerais do trabalho sugerem que a administração de eCG em associação com FSH não é benéfica para melhorar a resposta ovulatória ou a quantidade de embriões transferíveis em ovelhas Katahdin superovuladas.

Rutigliano et al. (2014) avaliaram o potencial superovulatório de um análogo de cadeia única do FSH humano quando administrado em ovelhas três dias antes, ou coincidente

com a luteólise simulada (remoção do pessário). Os autores concluíram que a gonadotrofina de cadeia simples humana com atividade de FSH promoveu superovulação em borregas na estação de monta. Uma única injeção da gonadotrofina recombinante três dias antes da luteólise também foi suficiente para sincronizar o pico de LH.

Na superovulação, a dose de pFSH ideal podem variar em função a idade, metabolismo, prolificidade, porte e/ou raça. Em ovelhas Morada Nova, os estudos utilizam concentrações que variam entre 133 e 250 mg, no entanto, aparentemente o aumento da dose deste hormônio não está relacionado a maiores rendimentos embrionários (ALMEIDA et al., 2002; LOPES-JÚNIOR et al., 2006; BRASIL et al., 2016). No entanto, em todos os estudos, foram utilizados tratamentos com progesterona de longa duração (14 dias) e coletas realizadas por método cirúrgico.

Segundo Amiridis e Cseh (2012), existe uma grande variabilidade na resposta superovulatória fazendo com que esta etapa seja considerada a mais crítica dentro de um programa de produção de embriões ovinos. Essa variação na resposta superovulatória é atribuída a uma série de fatores endógenos (genética da doadora, estado nutricional, estado folicular no momento da administração hormonal, estação do ano) e exógenos (tratamento superovulatório, natureza e possível "contaminação" do preparado gonadotrófico).

Levando em consideração que a coleta de embriões ovinos é realizada muitas vezes por técnicas cirúrgicas (laparotomia ou laparoscopia), a avaliação da resposta superovulatória antes do procedimento de coleta é de grande importância, porque impedirá que doadoras que não tenham respondido à superovulação passem por procedimentos demorados, caros e que interferem com o bem-estar animal. A avaliação da resposta superovulatória pode ser realizada com uso da ultrassonografia, observando o número de folículos durante a fase folicular ou de corpos lúteos formados no dia da coleta (RIESENBERG et al., 2001; GONZALEZ-BULNES et al., 2020) ou pela mensuração da concentração de progesterona um dia antes da coleta do embrião (AMIRIDIS et al., 2002).

Nos últimos anos tem-se buscado metodologias que permitam selecionar doadoras com maior potencial de resposta superovulatória. Dentre as técnicas mais testadas estão a contagem de folículos antrais (CFA), via ultrassonografia, sendo este um método fácil e de boa acurácia, a dosagem de hormônio anti-Mulleriano (AMH), pré-estimulação com eCG e além da repetibilidade da resposta superovulatória (PINTO et al., 2017; PINTO et al., 2018).

Monniaux et al. (2011) reportaram que as concentrações de AMH medidas no plasma de cabras antes do primeiro tratamento superovulatório foram altamente correlacionadas com

o número total de corpos lúteos ($r=0,71$, $P<0,01$), de estruturas coletadas ($r=0,87$, $P<0,001$), de embriões transferíveis ($r=0,83$, $P<0,001$) e de embriões congeláveis ($r=0,78$, $P<0,001$).

Oliveira et al. (2014) correlacionaram a perfusão vascular de folículos durante a superovulação com a resposta superovulatória em ovelhas Santa Inês. No entanto, os autores não observaram correlações significativas entre o fluxo sanguíneo e produção embrionária. Contudo, houve uma correlação positiva entre as estimativas quantitativas de fluxo de sangue folicular no último dia do tratamento superovulatório com o número e porcentagem de estruturas não fertilizadas. Dessa forma, os autores concluíram que a avaliação do fluxo sanguíneo de folículos é uma ferramenta comercialmente prática para prever resultados superovulatórios em ovelhas uma vez que há evidências da existência de um limiar de fluxo sanguíneo folicular que pode interferir negativamente na qualidade oocitária.

2.4.3 Monta natural ou inseminação artificial das doadoras

Em programas de MOTE, as doadoras podem ser fecundadas por monta natural ou inseminação artificial (laparoscopia ou transcervical). Independente do método e como estratégia de conservação, deve-se avaliar a combinação de doadoras e reprodutores, assegurando a variabilidade genética nos bancos de germoplasma (FAO, 2012). Além disso, é necessário que os padrões de qualidade espermática estejam adequados ao método de fecundação adotado, assim como em caso de monta natural, os machos devem possuir boa libido e condição física para realização dos acasalamentos (BARIL et al., 1995).

A monta natural pode ser realizada de forma livre, onde as doadoras são mantidas com o reprodutor e os acasalamentos realizados durante todo o período do estro, e também de forma controlada, onde as doadoras são direcionadas 2-3 vezes ao acasalamento, durante o estro, com intervalos de 12 horas (FONSECA et al., 2014). Em ovelhas Morada Nova submetidas à superovulação, os acasalamentos de 12 e 24 horas após início do estro possibilitaram uma taxa 80 % de fertilização (LOPES-JUNIOR et al., 2006).

A inseminação artificial em ovelhas, principalmente com sêmen congelado, é comumente realizada pela deposição de sêmen diretamente no útero, pela técnica de laparoscopia. A técnica transcervical é pouco utilizada, pois está frequentemente relacionada a falhas na fecundação, já que devido à dificuldade de transpor os anéis, em alguns casos, o sêmen é depositado na cérvix, o que compromete o transporte espermático (FONSECA et al., 2014).

Independente da técnica de inseminação utilizada, para obter alta taxa de fecundação dos óvulos, é importante realizar a inseminação no momento mais próximo da ovulação. Reyna et al. (2007) avaliaram o efeito da administração de GnRH sobre momento da ovulação de ovelhas Merino. Para isso, as ovelhas foram previamente sincronizadas com o uso de dispositivos intravaginais durante 12 dias e administração de eCG ao final do protocolo. Trinta e seis horas após a remoção dos dispositivos, as fêmeas receberam 40 µg de GnRH, sendo o estro e as ovulações monitoradas. Neste estudo, houve 100% de ovulação em fêmeas usando GnRH e ainda uma sincronização das ovulações nas ovelhas tratadas (2,8 dias) quando comparadas as não tratadas (5,7 dias). Desta forma, o uso de GnRH parece uma boa opção afim de garantir maior taxa de fecundação dos óvulos de fêmeas doadoras.

2.4.4 Coleta de embriões em ovinos

Em ovelhas, o acesso ao útero, necessário para recuperação e transferência dos embriões, pode ser realizado pela utilização de métodos cirúrgicos, como a laparotomia (WARWICK, 1934 *apud* FONSECA et al., 2006) ou a laparoscopia (SCHIWE, 1984; McKELVY et al., 1986), ou pelo método não cirúrgico, via transposição cervical (COONROD, 1986; FONSECA, 2006).

Na laparotomia, os embriões podem ser coletados no oviduto ou no útero. Para isso, as doadoras são previamente submetidas a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente. Antes do procedimento, as fêmeas recebem anestesia para minimizar o desconforto e a dor. Geralmente a sedação é realizada com cloridrato de xilazina (0,2 mg/kg PV) e ketamina, (10 mg/kg PV), por via i.m. (QUEVEDO et al., 2017). Uma anestesia local também é realizada com cloridrato de lidocaína (0,1 g/animal) na linha alba, local onde é realizada a incisão.

A exteriorização dos cornos uterinos é realizada com a fêmea em decúbito dorsal, em maca apropriada. A lavagem do oviduto ou do útero é realizada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 37 C. Para coletar embriões no oviduto, pode ser utilizado um cateter que é inserido no infundíbulo. Enquanto isso, uma agulha localizada na junção útero-tubárica, previamente inserida e acoplada a uma seringa de 20 mL, injeta o PBS em direção ao infundíbulo, onde os embriões são coletados (BARIL et al., 1995; LOPES-JÚNIOR et al 2006).

A coleta uterina pode ser realizada por uma sonda de Foley introduzida na base do corno uterino, e uma agulha inserida próxima à junção útero-tubárica, que acoplada à uma

seringa de 50 mL, permite a infusão de 30 a 40 mL de PBS. O líquido é infundido em cada um dos cornos uterinos, e os lavados geralmente depositados em placas de petri, para localização, recuperação e avaliação dos embriões.

A laparoscopia foi elaborada na tentativa de tornar a coleta de embriões menos invasiva, e, portanto, aumentar repetibilidade em doadoras (MCKELVEY et al., 1986). Para isto, os animais são submetidos a um jejum, onde água e alimento são retirados 24 horas antes do procedimento. Aplica-se sulfato de atropina (0,048 mg/ kg PV) por via subcutânea e assim como na laparotomia, para anestesia geral pode-se utilizar a associação de xilazina e ketamina, podendo ser mantido com anestesia inalatória.

Durante este procedimento as fêmeas são mantidas em decúbito dorsal, em macas, com uma angulação de cerca de 45° C. Uma cânula é inserida a esquerda da linha alba, e em seguida conectada ao endoscópio. A cavidade abdominal é insuflada e uma segunda cânula é inserida ao lado direito da linha alba, por onde é introduzida uma pinça atraumática para manipulação do trato reprodutivo. Cada corno uterino é posicionado pela base, e posteriormente puncionado com uma agulha de Mintz. Uma terceira cânula é inserida na linha alba, por onde uma sonda de três vias é introduzida na base do corno (BARIL et al., 1995). Um cateter é inserido na sonda, o mais próximo possível da junção útero-tubárica, e fixado pela pinça. O PBS é injetado pela sonda (40 mL a 50 mL) e coletado pelo cateter. Na coleta não cirúrgica via transcervical, as ovelhas devem ser submetidas a um protocolo de relaxamento cervical, que pode ser realizado com administração de 37.5 µg de d-cloprostenol e 1mg de benzoato de estradiol, ambos por via intramuscular, dezesseis horas antes da coleta. Com o mesmo propósito, as fêmeas também recebem 50 UI de ocitocina, via intravenosa, vinte minutos antes do início da coleta. Uma sedação leve pode ser realizada com acepromazina a 1% na dose de 1 mL / 100 kg, via intramuscular. Enquanto que para analgesia são administrados 10 mL (5 mL intramuscular; 5mL intravenosa) do composto de dipirona e hioscina. Uma anestesia local também é realizada com 1 mL de lidocaína a 2 %, sem vasoconstritor, via epidural (FONSECA et al., 2013; FONSECA et al., 2019a).

Um espéculo é introduzido no vestíbulo vaginal, e um algodão embebido com 5 mL de cloridrato de lidocaína é colocado ventralmente a abertura da cérvix, sendo mantido durante todo o procedimento. Com um espéculo de Collin e uma fonte de luz, a entrada da cérvix é identificada e imobilizada por uma pinça Embrapa® de tração cervical. Em seguida, duas pinças de Pozzi de 26 cm são colocadas lateralmente à abertura da cérvix e a tração cervical é realizada. Em seguida, dilatadores de Hegar são utilizados para transposição dos anéis cervicais. Após a transposição total, o dilatador é retirado e um cateter estéril, número 8,

equipado com um mandril de metal é usado para novamente tentar a transposição dos anéis cervicais. O cateter é direcionado ao corno uterino correspondente ao ovário com maior contagem de corpos lúteos (FONSECA et al., 2013).

As lavagens uterinas são realizadas em sistema fechado, sendo utilizados normalmente 180 mL de PBS para cada corno uterino. Após as lavagens, as pinças e o disco de algodão são removidos. Durante o procedimento as fêmeas permanecem em posição quadrupedal e ao término são imediatamente conduzidas aos piquetes, retomando o manejo normal, sem nenhuma restrição (FONSECA et al., 2013).

Em suma, embora o acesso uterino nas ovelhas seja mais facilmente realizado pelo uso dos métodos cirúrgicos (sendo esta uma vantagem), alguns pontos negativos devem ser considerados neste tipo de procedimento como a ocorrência de eventuais aderências devido às incisões, o jejum prolongado e anestesia geral que colocam em risco o bem estar e a vida destes animais (FONSECA et al., 2016; FONSECA et al., 2019b).

De maneira diferente, o método não cirúrgico pode ser realizado de maneira mais simples, com utilização de sedação leve, associada a um bloqueio peridural e anestesia cervical (FONSECA et al., 2016). Com este método, as fêmeas não precisam ser submetidas a jejum, o procedimento pode ser realizado com animal em estação (posição quadrupedal), e são poucas ou não existe formação de aderências (FONSECA et al., 2016), mas existem ainda grandes desafios na viabilização desta técnica entre elas a cérvix ovina.

Em ovelhas, protocolos de relaxamento cervical são indispensáveis para possibilitar as técnicas de recuperação e transferência de embriões não cirúrgicos, pois sem eles a penetração cervical não pode ser alcançada de forma eficiente durante a fase lútea (WULSTER-RADCLIFFE et al., 1999; GUSMÃO et al., 2007). Assim, com base nos conhecimentos da fisiologia do estro e do parto, eventos em que o relaxamento cervical ocorre naturalmente, protocolos de relaxamento vêm sendo elaborados (PINTO et al., 2019).

Dentre as principais substâncias empregadas para promover o relaxamento cervical estão as prostaglandinas sintéticas, ocitocina, misoprostol, dinoprostona, hormônio folículo estimulante (FSH), benzoato de estradiol e relaxina (GUSMÃO et al., 2009; FALCHI et al., 2012; BARTLEWSKI & CANDAPPA, 2015; MASOUDI et al., 2017; LEITE et al., 2018). Independente da substância, de maneira direta ou indireta, elas levam inicialmente a um aumento do estradiol e ao desenvolvimento de receptores de ocitocina (PRESTES & LANDIM-ALVARENGA, 2017), que por sua vez induz a produção e liberação de prostaglandina E (PGE2) (ARROWSMITH & WRAY, 2014).

A PGE2 promove alterações microestruturais nas fibras de colágeno da matriz extracelular cervical e relaxamento da musculatura lisa, dessa forma ela altera a distensão cervical (FELTOVICH et al., 2005; KERSHAW-YOUNG et al., 2009). Além disso, a PGE2 estimula a síntese dos glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico, que possui papel importante neste processo. Ele separa as fibras de colágeno por meio de uma maior hidratação da matriz extracelular, contribuindo ainda mais para o relaxamento cervical (CABROL et al., 1987; KERSHAW-YOUNG et al., 2009).

A eficiência do protocolo hormonal para relaxamento e transposição cervical depende de muitos fatores, entre eles a raça. O protocolo hormonal baseado no uso de benzoato de estradiol, ocitocina e d-cloprostenol (um análogo da prostaglandina F2 α) mostrou-se eficiente para ovelhas Santa Inês, Lacaune e Dorper (PRELLWITZ et al., 2019; DIAS et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b; SANTOS et al., 2020). Em ovelhas Morada Nova, este protocolo hormonal foi utilizado e permitiu passagem cervical em 100% dos animais, no entanto foi usado um número limitado de animais e a coleta de embriões não foi realizada (FONSECA et al., 2015).

Raças grandes tendem a ter tratos reprodutivos maiores com cervice mais longa (KERSHAW et al., 2005). Considerando que esta característica está associada a uma maior facilidade de penetração cervical em ovinos, visto que nesses casos o número de dobras é menor e há maior distância entre elas (KAABI et al., 2006), teme-se que em raças pequenas a penetração cervical seja mais difícil de executar.

Embora a coleta de embriões em ovelhas ainda seja feita principalmente por laparotomia, tem sido verificado que as coletas não cirúrgicas de embriões são igualmente eficientes (FONSECA et al., 2019b). Quando ambas as abordagens foram comparadas, o método não cirúrgico provou ser tão ou mais eficaz em termos de taxas de recuperação embrionária, além de menos estressante para os animais do que a laparotomia (OLIVEIRA et al., 2018; SANTOS et al., 2020). Além disso, avanços significativos na aplicação do método não cirúrgico foram alcançados recentemente em ovelhas Santa Inês (PRELLWITZ et al., 2019; SANTOS et al., 2020), Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b) e Dorper (DIAS et al., 2020) não superovuladas (sincronizadas em estro) e superovuladas.

Figueira et al. (2019) reportaram sucesso na coleta não cirúrgica de embriões em ovelhas Lacaune após protocolo de relaxamento cervical empregando 1 mg de benzoato de estradiol, 37,5 μ g de prostaglandina (d-cloprostenol) e 50 UI de ocitocina.

Em ovelhas Morada Nova, apenas a coleta por laparotomia foi empregada (LOPES-JÚNIOR et al., 2006; BRASIL et al., 2016) e na única tentativa pelo método não cirúrgico

para lavagem de embriões, foi realizada com o uso do cloridrato de bromexina como agente dilatador cervical, porém não houve sucesso (ALMEIDA et al., 2002). Desta forma, é possível que a metodologia não cirúrgica aplicada as raças comerciais, seja eficiente na coleta de embriões em ovelhas Morada Nova, ajudando a aumentar o número de embriões nos bancos de germoplasma.

**3 CAPÍTULO I – Artigo publicado no periódico Biopreservation and Biobanking -
Qualis (2013-2016) B1 – Medicina Veterinária (Anexo)**

**Recuperação Não Cirúrgica de Embriões de Ovelhas Morada Nova Após Sincronização
do Estro ou Superovulação: Uma Estratégia Viável para Bancos de Embriões Ovinos**

*Aline Matos Arrais¹; Marco Roberto Bourg de Mello¹; Gabriel Brun Vergani²; Lucas
Machado Figueira³, Sérgio Novita Esteves⁴; Verônica Schinaider do Amaral Pereira⁴; Pawel
Mieczyslaw Bartlewski⁵; Maria Emilia Franco Oliveira²; Joanna Maria Gonçalves Souza-
Fabjan³; Jeferson Ferreira da Fonseca^{6*}*

¹Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rodovia BR 465, Km7, s/n, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil; ²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil; ³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Cep 24230-340, Niterói, RJ, Brasil; ⁵Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, Km 234 s/nº, Fazenda Canchim, Caixa Postal: 339, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil; ⁶ Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada; ⁶Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4, CP D 10, CEP 62011000, Sobral, CE, Brasil

*Correspondence: Jeferson Ferreira da Fonseca, Embrapa Caprinos e Ovinos, Rodovia MG 133, Km 42, Cep 36155-000, Coronel Pacheco – MG, Brasil. Tel: +55 32 3311-7484. Fax: +55 32 3249-4901. Email: jeferson.fonseca@embrapa.br

3.1 RESUMO

Este estudo avaliou a viabilidade da produção de embriões *in vivo* e recuperação pela técnica não cirúrgica (NSER) em ovelhas Morada Nova (uma raça de ovinos nativos do Brasil e ameaçada de extinção) submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro e / ou superovulação. As ovelhas receberam esponjas intravaginais embebidas em 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), as quais foram mantidas no local por seis (G6; n = 12), nove (G9; n = 12) ou 12 (G12; n = 12) dias. Metade das ovelhas teve o estro sincronizado (SYNCH) e a outra metade foi submetida à superovulação (SOV) com 133 mg de hormônio folículo-estimulante suíno (pFSH). Não houve diferença ($P > 0,05$) na contagem de folículos antrais determinadas pela ultrassonografia 60 horas antes da remoção da esponja de MAP (ou no momento da primeira dose de pFSH) entre G6 ($6,4 \pm 0,9$), G9 ($6,2 \pm 0,7$) e G12 ($5,5 \pm 0,6$). As respostas de estro e as taxas de sucesso da NSER não variaram ($P > 0,05$) entre os três grupos de ovelhas com tratamento com progestágeno para animais com estro induzido ou superovulados. O início do estro ocorreu 10-12 horas depois ($P < 0,01$) em ovelhas G9_{SYNCH} em comparação com G6_{SYNCH} e G12_{SYNCH} e a duração do estro foi aproximadamente 19 horas maior ($P < 0,01$) em G9_{SOV} do que em G6_{SOV}. A duração média do procedimento NSER foi de $32,6 \pm 1,3$ min. Pelo menos uma estrutura foi recuperada em 85,7% das ovelhas sincronizadas e 87,5% das superovuladas. As taxas de recuperação de embriões viáveis também foram semelhantes ($P > 0,05$) para os grupos G6 ($1,0 \pm 0,3$ e $2,5 \pm 1,5$), G9 ($1,3 \pm 0,5$ e $4,8 \pm 2,0$) e G12 ($1,0 \pm 0,3$ e $4,8 \pm 2,3$) de ovelhas com estro sincronizado ou superovuladas, respectivamente. Conclui-se que o pré-tratamento com progestágeno de diferentes durações e a NSER podem ser empregados em ovelhas Morada Nova, resultando em taxas de recuperação embrionária viáveis para animais com estro sincronizado ou superovulados. Portanto, todas essas técnicas são adequadas para uso em ambientes comerciais, bem como em programas de conservação de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: ovinos, produção de embriões *in vivo*, raça naturalizada, coleta de embrião não cirúrgica, superovulação.

3.2 ABSTRACT

This study assessed the feasibility of *in vivo* embryo production and non-surgical embryo recovery (NSER) in Morada Nova ewes (an endangered native Brazilian breed of sheep) subjected to different estrus synchronization and/or superovulation protocols. The ewes received intravaginal sponges soaked with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP), which were kept in place for six (G6; n = 12), nine (G9; n = 12) or 12 (G12; n = 12) days. Half of the ewes remained estrus-synchronized only (SYNCH) and the other half was superovulated (SOV) with 133 mg of porcine follicle-stimulating hormone (pFSH). There were no differences ($P > 0.05$) in antral follicle counts determined with ultrasonography 60 h before MAP sponge removal (or at the time of first pFSH dose) among G6 (6.4 ± 0.9), G9 (6.2 ± 0.7) and G12 (5.5 ± 0.6). Estrus responses and NSER success rates did not vary ($P > 0.05$) among the three progestin-treatment groups of ewes for either estrus-induced or superovulated animals. The onset of estrus occurred 10-12 h later ($P < 0.01$) in G9_{SYNCH} ewes compared with G6_{SYNCH} and G12_{SYNCH} and the duration of estrus was ~19 h greater ($P < 0.01$) in G9_{SOV} than in G6_{SOV}. The average duration of NSER procedure was 32.6 ± 1.3 min. At least one structure was recovered in 85.7% of synchronized and 87.5% of superovulated ewes. Viable embryo recovery rates were also similar ($P > 0.05$) for G6 (1.0±0.3 and 2.5±1.5), G9 (1.3±0.5 and 4.8±2.0) and G12 groups (1.0±0.3 and 4.8±2.3) in estrus-synchronized and superovulated ewes, respectively. In conclusion, progestogen pre-treatment of different durations and NSER can be employed in Morada Nova ewes, resulting in reasonable viable embryo recovery rates in both estrus-synchronized and superovulated animals. Therefore, all these techniques are suitable for use in commercial settings as well as small ruminant conservation programs.

Keywords: sheep, *in vivo* embryo production, naturalized breed, non-surgical embryo recovery, superovulation.

3.3 INTRODUÇÃO

O Brasil, assim como muitos outros países colonizados, possui uma grande variedade de animais naturalizados, que se adaptaram às suas condições peculiares e diversas do bioma. Devido ao seu impacto na economia local e nas práticas agrícolas sustentáveis, várias raças de animais naturalizadas foram incluídas no programa de Conservação e Utilização de Recursos Genéticos fundado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 1983 (MARIANTE & EGITO, 2002). A Morada Nova é uma das principais raças de ovinos naturalizados no Brasil e o seu genótipo é provavelmente de origem africana, com alguma contribuição da raça portuguesa Bordaleira (LOBO et al., 2011). Os ovinos da raça Morada Nova são animais com pêlo e de tamanho relativamente pequeno (as ovelhas sexualmente maduras atingem o peso corporal de 30-50 kg), caracterizado por prolificidade moderada (1,5 filhotes) e boa capacidade de produção de carne e pele mesmo em condições climáticas desfavoráveis (FACÓ et al., 2008). Apesar de sua importância para sistemas de produção sustentáveis (LOBO et al., 2011), o cruzamento indiscriminado devido à preferência geral dos criadores de ovinos por raças mais especializadas levou as ovelhas Morada Nova à uma condição considerada como em risco de extinção (LOBO et al., 2011; MCMANUS et al., 2013; MCMANUS et al., 2019). Em 2009, a raça Morada Nova se agregou ao programa de conservação de recursos genéticos desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que tem como objetivos a criação de bancos de germoplasma para raças e espécies ameaçadas de extinção.

As técnicas reprodutivas são ferramentas essenciais para salvar e manter espécies ameaçadas de extinção (COMIZZOLI, 2015). As técnicas de reprodução assistida, como a produção de embriões *in vivo* (PIV), são essenciais para superar o risco de extinção de animais. Essas técnicas aceleram a propagação genética em rebanhos, aumentam o ganho genético de machos e fêmeas, e os embriões resultantes podem ser criopreservados para criar bancos de germoplasma. As doadoras usadas para PIV são normalmente submetidas a tratamentos superovulatórios conduzidos em conjunto com um protocolo de sincronização de estro usando progestágenos exógenos (por exemplo, acetato de medroxiprogesterona - MAP). No entanto há uma enorme variabilidade nas respostas ovarianas aos protocolos de sincronização de estro e ovulação em ovelhas (BARTLEWSKI et al., 1999). No passado, nossa equipe de pesquisa desenvolveu estudos com objetivo de estabelecer a duração ideal do tratamento com dispositivos de liberação de progesterona para sincronização do estro e superovulação em ovelhas Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b) e

Santa Inês (OLIVEIRA et al., 2020). Até o momento, entretanto, houve apenas três tentativas documentadas de realizar superovulação hormonal em ovelhas Morada Nova da variedade branca (LOPES-JÚNIOR et al., 2006) e vermelha (ALMEIDA et al., 2002; BRASIL et al., 2016), e todos esses estudos utilizaram o período de longo prazo (14 dias) para permanência da esponja com progesterona. Embora o emprego de progesterona seja essencial para sincronizar o estro e as ovulações e também para reduzir a incidência de corpos lúteos inadequados após o acasalamento, a exposição a longo prazo (10-18 dias) à dispositivos intravaginais de liberação de progesterona pode estar associada ao declínio da fertilidade em ovelhas (VIÑALES et al., 2001). Encurtar o período de tratamento com progesterona também é desejável uma vez que reduz a perda de dispositivos intravaginais, bem como a ocorrência de secreções e infecções vaginais não desejadas (FONSECA & TORRES, 2005).

Em cabras Saanen em anestro, tratamentos de sincronização de estro usando esponjas impregnadas de progestágeno inseridas por 6, 9 ou 12 dias produziram comportamento estral e parâmetros ovarianos semelhantes (PIETROSKI et al., 2013), mas tal estudo comparativo não existe para ovelhas Morada Nova.

Embora a coleta de embriões em ovelhas ainda seja feita principalmente por laparotomia, há muitas evidências que sugerem que a recuperação de embriões pela técnica não cirúrgica (NSER) seja igualmente eficiente (FONSECA et al., 2019b). Quando ambas as abordagens foram comparadas, o NSER provou ser tão ou mais eficaz em termos de taxas de recuperação embrionária, mas significativamente menos estressante para os animais do que a laparotomia (OLIVEIRA et al., 2018; SANTOS et al., 2020). Além disso, avanços significativos na aplicação de NSER foram alcançados recentemente em ovelhas Santa Inês não superovuladas (sincronizadas em estro) e superovuladas (OLIVEIRA et al., 2020; PRELLWITZ et al., 2019), Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b) e Dorper (DIAS et al., 2020). Em ovelhas Morada Nova, no entanto, dois estudos anteriores empregaram laparotomia (LOPES-JÚNIOR et al., 2006; BRASIL et al., 2016) e a única tentativa de usar NSER para lavagem de embriões foi malsucedida (ALMEIDA et al., 2002). À luz das preocupações atuais sobre o bem-estar animal (MARTIN, 1995; MARTIN & KADOKAWA, 2006; GONZALEZ-BULNES et al., 2020), o desenvolvimento de uma técnica eficiente para NSER em diferentes linhagens de ovinos é de extrema importância.

Tal como acontece com outras raças ou espécies ameaçadas de extinção, tanto os regimes superovulatórios quanto as técnicas de coleta de embriões devem ser consideradas para implementar de maneira eficiente um banco de germoplasma.

Além disso, a recuperação de embriões de animais não superovulados também pode contribuir para o enriquecimento dos bancos de germoplasma (MACHADO et al., 2016; LEROY et al., 2019). A criopreservação é uma das melhores estratégias para a formação de bancos de germoplasma. Embora o congelamento e armazenamento de embriões sejam mais caros do que a preservação de gametas, o uso de embriões está associado a reconstituição racial acelerada em comparação com aquela obtida usando apenas sêmen (BOETTCHER et al., 2005). E por último, o uso de abordagens menos invasivas é altamente preferível em programas de conservação de animais em extinção. Assim, o objetivo principal do presente estudo foi comparar as respostas ovarianas e as taxas de produção de embriões *in vivo* em ovelhas Morada Nova superovuladas e não superovuladas submetidas a curtos (6d), médios (9d) ou longos (12d) protocolos de sincronização de estro à base de progestágeno e NSER.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Condições gerais do experimento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Embrapa Pecuária de Leite (processo: 2512100516). O presente experimento foi realizado durante a estação reprodutiva (julho a agosto) em São Carlos, Brasil (latitude 22 ° 01'S, longitude 47 ° 54'W, altitude 850 m.a.s.l.). Trinta e seis ovelhas multíparas clinicamente saudáveis e quatro carneiros da raça Morada Nova (variedade vermelha) foram utilizados neste estudo. Nenhum animal mostrou quaisquer sinais de anomalias reprodutivas detectáveis com exames ultrassonográficos e ginecológicos / andrológicos. Os animais foram mantidos em piquetes de *Panicum maximum* cv. Capim Aruana e receberam rações diárias de concentrado, de acordo com sua demanda nutricional. Sal mineral e água estavam disponíveis *ad libitum*.

3.4.2 Delineamento experimental

Os protocolos de sincronização do estro e de superovulação estão descritos na Figura 1. As ovelhas Morada Nova foram distribuídas por idade, peso e escore de condição corporal (ECC; 1 = magras a 5 = obesas) em três grupos (cada n = 12; Fig. 1). Todas as ovelhas receberam esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP; Progespon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) que foram mantidas no local por seis (G6; idade: 49,0 ± 4,3 meses, peso: 40,5 ± 1,2 kg, e ECC de 3,3 ± 0,1), nove (G9; idade: 51,0 ± 5,1 meses, peso: 41,2 ± 1,7 kg, e ECC de 3,3 ± 0,1) ou 12 dias (G12; idade: 51,0 ± 4,2 meses,

peso: $41,6 \pm 1,6$ kg e BCS de $3,3 \pm 0,1$). As esponjas foram inseridas e retiradas entre 17:00h e 18:00h. As ovelhas submetidas à sincronização do estro ($G6_{\text{SYNCH}}$, $G9_{\text{SYNCH}}$ e $G12_{\text{SYNCH}}$) receberam 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon 5000®, MSD Animal Health, Cruzeiro, SP, Brasil) i.m. e 37,5 µg de um análogo de $\text{PGF2-}\alpha$ (d-cloprostenol; Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina), i.m., 12 horas antes da remoção da esponja (MAP). Os demais animais ($G6_{\text{SOV}}$, $G9_{\text{SOV}}$ e $G12_{\text{SOV}}$) foram submetidos ao tratamento superovulatório com 133 mg de hormônio folículo-estimulante suíno (pFSH; Folltropin®, Vetoquinol, Mairiporã, SP, Brasil), administrado em intervalos de 12 horas em seis doses decrescentes (25- 25-15-15-10-10 % da quantidade total de pFSH), começando 60 horas antes da remoção da esponja de MAP. Todas as ovelhas também receberam 50 µg de acetato de gonadorelina (Gestran®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) 36 horas após a remoção da esponja. O estro foi detectado duas vezes ao dia e as ovelhas foram direcionadas ao acasalamento com carneiros férteis. Todas as ovelhas foram acasaladas no início do estro e 24 horas depois se ainda estivessem no cio. A cada detecção de estro, as ovelhas que não haviam sido acasaladas (por exemplo, iniciando o estro) foram priorizadas enquanto o grupo de ovelhas iniciando o estro ao mesmo tempo teve a segunda cobertura em seqüência invertida do primeiro acasalamento. Os carneiros montavam de 1 a 4 ovelhas por dia durante quatro dias.

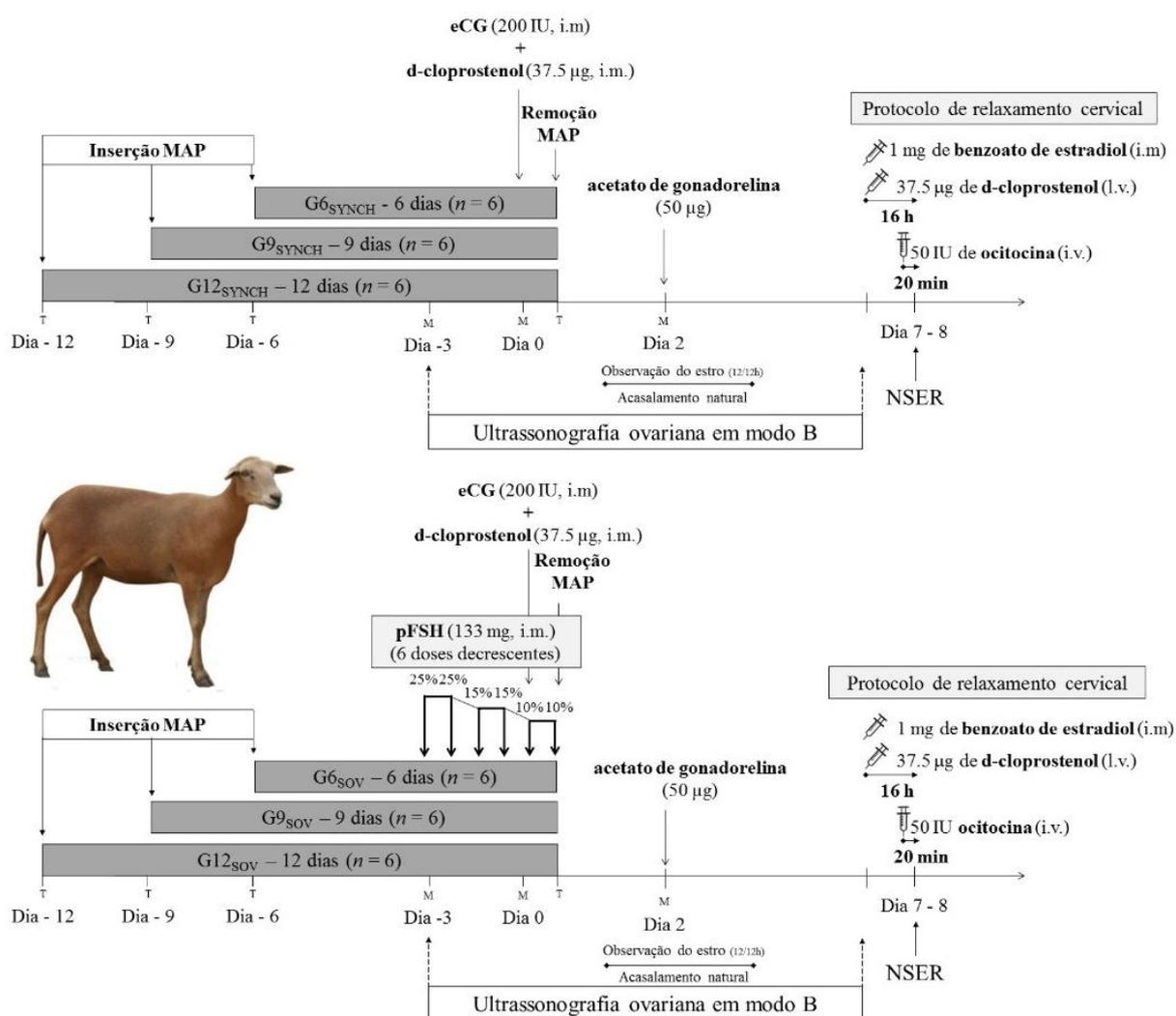


Figura 2. Representação esquemática dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar protocolos de sincronização de estro e / ou superovulação a curto (6 dias), médio (9 dias) ou longo prazo (12 dias) e para verificar a viabilidade de recuperação não cirúrgica de embriões (NSER) nas ovelhas Morada Nova. T = período da tarde; M = período da manhã; MAP = acetato de medroxiprogesterona; eCG = gonadotrofina coriônica equina; i.m.= intramuscular; i.v. = intravenosa; l.v. = latero-vulvar.

3.4.3 Avaliação ultrassonográfica dos ovários

Todas as ovelhas foram submetidas a exames ultrassonográficos 60 horas antes da retirada das esponjas (momento correspondente a primeira dose de pFSH em ovelhas superovuladas) e 16 horas antes da coleta para determinar o número de folículos antrais visíveis e de corpos lúteos (CL), respectivamente. Para ambas as avaliações, os ovários foram avaliados com um ultrassom portátil modo B e Doppler (M5 Vet®, Mindray, Shenzhen, China) equipado com um transdutor transretal de 7,5 MHz adaptado para uso em pequenos

ruminantes. Os folículos ovarianos foram agrupados de acordo com seus diâmetros em: Classe 1 (≤ 2 mm), Classe 2 (2,1 a 3,0 mm), Classe 3 (3,1 a 4,0 mm), Classe 4 (4,1 a 5,0 mm) e Classe 5 ($> 5,0$ mm) conforme descrito por Viñoles et al. (2004).

3.4.4 Procedimentos para coleta de embriões pela técnica não cirúrgica (NSER)

Todas as ovelhas que manifestaram estro foram submetidas à coleta pelo método não cirúrgico, 6 a 7 dias após o início da manifestação do cio. Dezesesseis horas antes da coleta, as fêmeas receberam 37.5 μ g de d-cloprostenol (Prolise®, ARSA SRL, Buenos Aires, Argentina) e 1 mg de benzoato de estradiol (Benzoato HC®, Hertape Calier, Minas Gerais, Brasil), ambas por via intramuscular, para indução do relaxamento cervical. Com o mesmo propósito, as fêmeas receberam também 50 UI de ocitocina (Ocitocina Forte UCB®, UCB saúde animal, São Paulo - Brasil) via intravenosa, vinte minutos antes do início da coleta. Uma ampla tricotomia foi realizada na região da inserção da cauda. A região perineal foi higienizada com papel toalha.

Vinte minutos antes do início da coleta, as ovelhas foram tranquilizadas com acepromazina a 1 % (Acepran 1 % ®, Vetinil / Univet, São Paulo, Brasil) na dose de 1 mL / 100 kg, via intramuscular. Para a analgesia, administrou-se 10 mL (5 mL intramuscular; 5 mL intravenosa) do composto de dipirona e hioscina (Buscofin®, Agener União- Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Imediatamente antes a introdução do espéculo vaginal, as fêmeas receberam anestesia regional pela administração de 1 mL de cloridrato de lidocaína 2 %, sem vasoconstritor, na região sacrococcígea, via epidural. Após inserção do espéculo, um disco de algodão embebido com 5 mL do cloridrato de lidocaína, foi colocado e mantido ventralmente a abertura cervical durante o período do procedimento.

Um espéculo de Collin (tamanho 1-2), previamente lubrificado com gel, foi introduzido na vulva e vagina das fêmeas para exploração do vestíbulo vaginal. Com auxílio de uma fonte de luz, a entrada da cérvix foi identificada e imobilizada por uma pinça Embrapa ® de tração cervical. Em seguida, duas pinças de pinça Pozzi de 26 cm foram colocadas de 0,5 a 1 cm lateralmente à abertura da cérvix e a tração cervical foi realizada.

Dilatadores de Hegar (tamanhos 3 a 4) foram inicialmente utilizados para transpor os anéis cervicais. Após a transposição total, o dilatador de Hegar foi mantido por 30 segundos dentro da cérvix. O “mapa cervical” representando a localização de todos os anéis cervicais (FONSECA et al., 2019a) e o tempo gasto para atravessar a cervix foram registrados. Um cateter estéril, número 8, equipado com um mandril de metal foi usado para contornar os

novamente os anéis cervicais. A resistência foi perdida após a transposição total dos anéis. Em seguida, a cérvix foi ligeiramente tracionada para trás e o cateter foi direcionado ao corno uterino correspondente ao ovário com maior contagem de corpos lúteos.

Lavagens uterinas foram realizadas em sistema fechado, por um circuito conectado ao cateter (Circuito Embrapa® para recuperação de embriões caprinos /ovinos; Embrapa, Brasil). Um total de 180 mL de meio DPBS, aquecido a 37° C, foi utilizado para lavagem de cada corno uterino. Após as lavagens, as pinças e o disco de algodão foram cuidadosamente removidos do vestíbulo vaginal. Todos os processos foram realizados com animal em estação. Ao término dos procedimentos de coleta, as fêmeas foram conduzidas aos piquetes, retomando o manejo normal, sem nenhuma restrição. Todas as estruturas recuperadas, incluindo as não fertilizadas, foram registradas de acordo com a condição de fertilização (fertilizados e não fertilizados), e os embriões foram classificados com base em seu estágio de desenvolvimento (mórulas a blastocisto expandido) e qualidade (1 = excelente ou bom, 2 = razoável, 3 = pobre e 4 = morto ou degenerado) conforme detalhado no manual da IETS - International Embryo Technology Society (STRINGFELLOW & GIVENS, 2010). Embriões de qualidade 1 a 3 foram criopreservados por congelamento lento de acordo com um método descrito por Figueira et al. (2019).

3.4.5 Variáveis e análise estatística

Os seguintes dados foram registrados 60 horas antes da remoção da esponja de MAP nas ovelhas sincronizadas ou no momento da primeira injeção de pFSH nas superovuladas: porcentagem de ovelhas apresentando folículos antrais ≥ 5 mm de diâmetro; diâmetro do maior folículo (mm); contagem total de folículos e número de folículos em diferentes classes de tamanho por ovelha (classe 1: ≤ 2 mm; classe 2: 2,1 a 3,0 mm; classe 3: 3,1 a 4,0 mm; classe 4: 4,1 a 5,0 mm; classe 5: $> 5,0$ mm). Posteriormente, os seguintes dados foram registrados ou calculados: resposta ao estro (número de ovelhas em estro / número de ovelhas tratadas $\times 100\%$); tempo de início do estro (em horas, tempo desde a remoção da esponja de MAP até a detecção do estro); duração do estro (em horas); número de corpos lúteos (CLs) por ovelha; porcentagem de ovelhas penetradas e lavadas com sucesso (ovelhas lavadas / número total de ovelhas $\times 100\%$); número de CLs por ovelha lavada; duração do procedimento de penetração cervical por Hegar e mandril / cateter (em minutos, tempo desde o dilatador de Hegar ou inserção do mandril / cateter até sua remoção); duração do procedimento de lavagem uterina (em minutos, tempo desde a inserção do cateter de lavagem

até sua remoção); duração do procedimento de recuperação embrionária não cirúrgica (NSER) (em minutos, tempo desde a anestesia peridural até a remoção do cateter / liberação cervical); eficiência de recuperação de fluido (volume de fluido recuperado / fluido total infundido \times 100%); taxa de recuperação (número total de estruturas recuperadas / número de CL detectado com ultrassonografia \times 100%); taxa de viabilidade embrionária (número de embriões de qualidade de 1 a 3 / estruturas totais recuperadas \times 100%); taxa de recuperação de sucesso (número de ovelhas com pelo menos uma estrutura recuperada / número de ovelhas lavadas \times 100%); número total de estruturas (ou seja, embriões + estruturas não fertilizadas) recuperadas por ovelha; número de embriões viáveis (qualidade 1 a 3) recuperados por ovelha; e número de embriões degenerados por ovelha.

A análise dos dados foi realizada com o software R (versão 3.6.1, The R Foundation for Statistical Computing). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos e a homogeneidade da variância foi avaliada pelo teste de Levene. Sempre que necessário, foi realizada a transformação Box-Cox dos dados originais. As análises não paramétricas foram feitas com os testes de Kruskal-Wallis, Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Os dados paramétricos foram testados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação dos valores médios individuais. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), a menos que indicado de outra forma. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

3.5 RESULTADOS

Os parâmetros foliculares registrados 60 horas antes da remoção da esponja de MAP em todas as ovelhas estudadas estão apresentados na Tabela 1. Nenhuma diferença foi observada ($P > 0,05$) para qualquer um dos parâmetros relacionados à população de folículos antrais entre os três grupos de ovelhas (expostas a pré-tratamentos com progesterona de duração variável).

Tabela 1. Parâmetros (% ou média \pm SEM) relacionados à população de folículos antrais determinados por ultrassonografia 60 horas antes da remoção da esponja de MAP em ovelhas Morada Nova que foram submetidas a pré-tratamento com progesterona de curto (6 d, G6), médio (9 d, G9) ou longo prazo (12 d, G12).

Variáveis	G6	G9	G12
Ovelhas com folículos ≥ 5 mm (%)	50,0 (6/12)	41,7 (5/12)	25,0 (3/12)
Diâmetro do maior folículo (mm)	4,8 \pm 0,4	4,7 \pm 0,3	4,4 \pm 0,3
Contagem total de folículos	6,4 \pm 0,9	6,2 \pm 0,7	5,5 \pm 0,6
Número de folículos:			
Classe 1 (≤ 2 mm)	2,3 \pm 0,6	3,1 \pm 0,7	1,3 \pm 0,3
Classe 2 (2,1 to 3,0 mm)	1,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,9 \pm 0,5
Classe 3 (3,1 to 4,0 mm)	0,9 \pm 0,3	0,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
Classe 4 (4,1 to 5,0 mm)	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1
Classe 5 ($> 5,0$ mm)	0,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1

Vários outros parâmetros avaliados após a retirada da esponja de MAP de ovelhas Morada Nova sincronizadas ou superovuladas estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Em ovelhas com estro sincronizado, o intervalo médio entre a remoção da esponja de MAP até o início do estro foi aproximadamente 10-12 horas mais longo ($P < 0,01$) para ovelhas G9_{SYNCH} em comparação com os animais submetidos ao protocolo G6_{SYNCH} ou G12_{SYNCH} (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis analisadas (% ou média ± EP) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolos de sincronização de estro com diferentes tempos de duração de MAP e coleta pelo método não cirúrgico, 6 a 7 dias após o início de estro.

Variáveis	G6_{SYNCH}	G9_{SYNCH}	G12_{SYNCH}
Resposta ao estro (%)	100,0 (6/6)	83,3 (5/6)	100,0 (6/6)
Início do estro (h)	38,0 ± 3,7 ^b	48,0 ± 0,0 ^a	36,0 ± 0,0 ^b
Duração do estro (h)	24,0 ± 0,0	19,2 ± 2,9	26,0 ± 2,0
Número de corpos lúteos por ovelha	1,8 ± 0,3 [11]	2,8 ± 0,4 [14]	2,0 ± 0,3 [12]
Ovelhas penetradas e lavadas com sucesso (%)	83,3 (5/6)	80,0 (4/5)	83,3 (5/6)
Número de corpo lúteos por ovelha coletada	1,8 ± 0,4 [9]	2,8 ± 0,5 [11]	1,8 ± 0,2 [9]
Duração da penetração cervical por Hegar (min)	5,8 ± 2,2	2,8 ± 0,9	2,0 ± 0,3
Duração da penetração cervical por mandril/cateter (min)	2,2 ± 0,5	2,3 ± 0,3	4,2 ± 1,5
Duração do procedimento de lavagem uterina (min)	21,1 ± 4,8	19,8 ± 7,0	23,1 ± 5,8
Duração do procedimento de NSER (min)	33,6 ± 1,7	34,8 ± 1,8	32,4 ± 3,2
Eficiência da recuperação de líquido (%)	99,5 ± 0,5 (97 a 100)	100,0 ± 0,0 (100)	100,0 ± 0,0 (100)
Taxa de recuperação (%)	77,7 [7/9]	45,4 [5/11]	55,5 [5/9]
Taxa de viabilidade embrionária (%)	71,4 [5/7]	100,0 [5/5]	100,0 [5/5]
Ovelhas com estruturas recuperadas (%)	100,0 (5/5)	75,0 (3/4)	80,0 (4/5)
Ovelhas com embriões viáveis recuperados (%)	80,0 (4/5)	75,0 (3/4)	80,0 (4/5)
Total de estruturas recuperadas por ovelha	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3
Embriões viáveis por ovelha	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3
Embriões degenerados por ovelha	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Estruturas não fertilizadas por ovelha	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os protocolos de sincronização consistiram em 60 mg de esponja intravaginal de acetato de medroxiprogesterona (MAP) por 6, 9 ou 12 dias, com aplicação de 200 UI de eCG e 37,5 µg de d-cloprostenol 12 h antes da remoção da esponja; além disso, 50 µg de acetato de gonadorelina foram aplicados 36 h após o tratamento com MAP. () número de animais ou intervalo. [] número total de corpos lúteos ou estruturas ou suas proporções; a, b Dentro de uma linha, as médias com sobrescritos de letras diferentes diferem significativamente (P <0,05).

A duração do estro foi maior (P <0,01) com o protocolo G9_{SOV} em comparação ao protocolo G6_{SOV} (Tabela 3). Todas as ovelhas que tiveram a cérvix atravessada com sucesso pelo Hegar também puderam ser penetradas pelo mandril / cateter e submetidas à lavagem uterina para coleta dos embriões. Não houve diferença (P > 0,05) para nenhum dos parâmetros que descrevem as respostas do estro ou a eficiência do procedimento NSER entre os três subconjuntos de ovelhas, variando na duração da exposição ao progestágeno em animais sincronizados (Tabela 2) ou superovulados (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis analisadas (% ou média \pm EP) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolos de sincronização de estro com diferentes tempos de duração de MAP, superovulação e coleta de embriões pelo método não cirúrgico, 6 a 7 dias após o início do estro.

Variáveis	G6 _{sov}	G9 _{sov}	G12 _{sov}
Resposta ao estro (%)	100,0 (6/6)	83,3 (5/6)	100,0 (6/6)
Início do estro (h)	22,0 \pm 2,0	16,8 \pm 2,9	26,0 \pm 3,7
Duração do estro (h)	34,0 \pm 3,7 ^b	52,8 \pm 4,8 ^a	40,0 \pm 4,0 ^{ab}
Número de corpos lúteos por ovelha	7,8 \pm 2,8 [47]	12,0 \pm 1,5 [60]	11,5 \pm 1,9 [69]
Ovelhas penetradas e lavadas com sucesso (%)	100,0 (6/6)	100,0 (5/5)	83,3 (5/6)
Número de corpos lúteos por ovelha coletada	7,8 \pm 2,8 [47]	12,0 \pm 1,5 [60]	10,4 \pm 1,8 [52]
Duração da penetração cervical por Hegar (min)	4,7 \pm 1,1	2,2 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4
Duração da penetração cervical por mandril/cateter (min)	2,0 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4
Duração do procedimento de lavagem uterina (min)	30,2 \pm 4,6	20,1 \pm 5,0	20,1 \pm 4,6
Duração do procedimento de NSER (min)	37,3 \pm 4,9	29,0 \pm 2,9	28,2 \pm 1,8
Eficiência da recuperação de líquido (%)	99,0 \pm 1,0 (94 to 100)	98,5 \pm 1,5 (92 to 100)	100,0 \pm 0,0 (100)
Taxa de recuperação (%)	44,6 [21/47]	66,6 [40/60]	65,3 [34/52]
Taxa de viabilidade embrionária (%)	71,4 [15/21]	60,0 [24/40]	70,5 [24/34]
Ovelhas com estruturas recuperadas (%)	66,6 (4/6)	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)
Ovelhas com embriões viáveis recuperados (%)	66,6 (4/6)	80,0 (4/5)	100,0 (5/5)
Total de estruturas recuperadas por ovelha	3,5 \pm 1,5	8,0 \pm 2,7	6,8 \pm 2,9
Embriões viáveis por ovelha	2,5 \pm 1,5	4,8 \pm 2,0	4,8 \pm 2,3
Embriões degenerados por ovelha	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,2	0,7 \pm 0,7
Estruturas não fertilizadas por ovelha	1,0 \pm 0,7	2,8 \pm 1,6	1,2 \pm 0,7

O protocolo superovulatório consistiu em 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) esponja intravaginal por 6 (G6_{sov}), 9 (G9_{sov}) ou 12 (G12_{sov}) dias com 133 mg de pFSH administrado em seis doses decrescentes (25-25-15-15-10- 10%) em intervalos de 12 horas começando 60 horas antes da remoção da esponja de MAP; 200 UI de eCG e 37,5 μ g de cloprostenol foram administrados 12 horas antes do final do tratamento com MAP; adicionalmente, 50 μ g de acetato de gonadorelina foram aplicados 36 horas após a remoção da esponja de MAP. () número de animais ou intervalo. [] número total de corpos lúteos ou estruturas ou suas proporções; a, b. Dentro de uma linha, as médias com sobrescritos de letras diferentes diferem significativamente (P <0,05).

Os parâmetros avaliados foram, posteriormente, agrupados para todos os animais superovulados (SOV) e sincronizados (SYNCH), independentemente da duração do tratamento com MAP, e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis analisadas (% ou média \pm EP) em ovelhas Morada Nova submetidas ao protocolo de sincronização de estro (SYNCH) ou de superovulação (SOV).

Variáveis	SYNCH	SOV	Valor P
Resposta ao estro (%)	94.4 (17/18)	94.4 (17/18)	n.s.
Início do estro (h)	40. \pm 1.8	21.9 \pm 1.9	<0.001
Duração do estro (h)	23.3 \pm 1.2	41.6 \pm 2.9	<0.001
Número de corpos lúteos por ovelha	2.2 \pm 0.3 [37]	10.4 \pm 1.3 [176]	<0.01
Ovelhas penetradas e lavadas com sucesso (%)	82.3 (14/17)	94.1 (16/17)	n.s.
Número de corpos lúteos por ovelha coletada	2.1 \pm 0.2 [29]	9.9 \pm 1.2 [159]	<0.01
Duração da penetração cervical com dilatador Hegar (min)	3.6 \pm 0.9	3.0 \pm 0.5	n.s.
Duração da penetração cervical com madril/cateter (min)	3.0 \pm 0.6	1.8 \pm 0.2	<0.05
Duração do procedimento de coleta (min)	33.5 \pm 1.3	31.9 \pm 2.3	n.s.
Eficiência de recuperação de líquido (%)	99.8 \pm 0.2	99.2 \pm 0.6	n.s.
Estruturas recuperadas (%)	58.6 [17/29]	59.7 [95/159]	n.s.
Ovelhas com sucesso na recuperação de estruturas (%)	85.7 (12/14)	87.5 (14/16)	n.s.
Total de estruturas recuperadas por ovelha coletada	1.2 \pm 0.2	5.9 \pm 1.4	<0.01
Estruturas não fertilizadas	0.0 \pm 0.0	1.6 \pm 0.6	<0.05
Embriões não viáveis	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	n.s.
Embriões viáveis	1.1 \pm 0.2	3.9 \pm 1.1	<0.05
Viabilidade de embriões (%)	88.2 [15/17]	66.3 [63/95]	n.s.

SYNCH = Fêmeas que foram submetidas a sincronização de estro com esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 6 (curto-), 9 (intermediário-) ou 12 (longo prazo) dias, mais 200 UI de gonadotrofina coriônica equina e 37,5 μ g de cloprostenol administrados 12 h antes e 50 μ g de acetato de gonadorelina administrados 36 h após a remoção do dispositivo. SOV = fêmeas que foram superovuladas com 133 mg de folículo porcino- hormônio estimulante (pFSH). O pFSH foi administrado em seis doses decrescentes (25-25-15-15-10-10%) em intervalos de 12 h, começando 60 h antes da remoção do dispositivo, e a coleta de embriões por método não cirúrgico foi realizada 6 a 7 dias após o início do estro comportamental. () número de animais ou intervalo. [] número total de corpos lúteos ou estruturas ou suas proporções; a, b Dentro de uma linha, as médias com sobrescritos de letras diferentes diferem significativamente (P <0,05).

3.6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de produção de embriões *in vivo* seguido por NSER em uma raça de ovinos naturalizada brasileira (Morada Nova) e em risco de extinção (FACÓ et al., 2008; MCMANUS et al., 2019). Portanto, este estudo nos ajudou a reunir informações úteis sobre os resultados da sincronização do estro e protocolos de estimulação hormonal ovariana, bem como a viabilidade da NSER em ovelhas Morada Nova. De todas as indicações, a NSER é um método valioso não apenas para aplicações comerciais, mas também para fins de conservação genética em pequenos ruminantes.

O início do estro foi retardado em ovelhas G9_{SYNCH} em comparação com os outros dois grupos de ovelhas Morada Nova induzidas por estro. (HARL, 2012) relatou que os esquemas de sincronização de estro baseados em progestágeno empregados por curto período foram associados a um início tardio do estro em ovelhas durante a estação reprodutiva, indicando a ocorrência de um período tardio e / ou mais longo de maturação folicular antral. Como os exames ultrassonográficos não revelaram quaisquer diferenças nas populações de folículos antrais entre os três grupos 60 horas antes da remoção da esponja, essa diferença é mais provavelmente devido a sutis dissimilaridades na concentração de estrógeno folicular (BARTLEWSKI et al., 2001). É possível que os folículos antrais dominantes em ovelhas G6_{SYNCH} tenham sido recrutados da primeira onda folicular ovariana emergindo após a inserção da esponja (CARVALHO-DE-PAULA et al., 2020). Esses folículos podem ainda estar em sua fase de crescimento na época da retirada da esponja de MAP, o que resultou na obtenção mais precoce do limiar de estradiol responsável pelo estro comportamental em comparação com o grupo G9_{SYNCH} (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Adicionalmente, a duração de estro comportamental foi maior no G9_{SOV} em comparação com ovelhas superovuladas com G6_{SOV} (Tabela 3). Esse fato também pode estar relacionado ao estágio do folículo dominante no momento em que as esponjas de MAP foram removidas uma vez que, numericamente ($P > 0,05$), foi observado maior número de folículos ovulatórios potencialmente estrogênicos no G9_{SOV} (12,0 CL) do que no G6_{SOV} (7,8 CL). No entanto, nossas observações atuais indicam que protocolos de indução de estro de curto, médios e longos prazos podem ser usados em ovelhas Morada Nova cíclicas.

A eficiência média de lavagem uterina, bem como a produção de embriões viáveis e as taxas de recuperação para ovelhas Morada Nova não superovuladas foram comparáveis às aquelas reportadas recentemente em ovelhas Santa Inês (FONSECA et al., 2018, 2019; PRELLWITZ et al., 2019) e Lacaune sincronizadas (FIGUEIRA et al., 2020a). Considerando o baixo nível de invasividade da técnica não cirúrgica (NSER) em comparação à laparotomia (SANTOS et al., 2020), o uso deste método permite recuperações frequentes de embriões em ovelhas Morada Novas após a sincronização do estro. A coleta não cirúrgica pode ser realizada com sucesso em ovelhas Morada Nova não superovuladas produzindo, em média, um embrião viável por ovelha, sem a necessidade de privação de alimento e água, e sendo realizada com os animais contidos em estação e na presença de outros animais. Claramente, ovelhas não superovuladas podem ser uma fonte adicional de material genético valioso, com as ovelhas sendo submetidas à sincronização de estro e coleta sendo devolvidas posteriormente ao rebanho, sem quaisquer efeitos adversos em sua fertilidade e estado geral de saúde (DIAS et al., 2020).

O número médio de embriões viáveis por ovelha doadora nos grupos G9_{SOV} e G12_{SOV} do presente estudo (~5 embriões viáveis por ovelha coletada) foi semelhante ao recuperado por laparotomia de ovelhas Morada Nova superovuladas [4,9 a 5,6 embriões viáveis por ovelha lavada (BRASIL et al., 2016; LOPES et al., 2006)]. Isso é altamente encorajador e justifica mais pesquisas com a implementação da superovulação combinada com coleta por método não cirúrgico em ovelhas Morada Nova e outras espécies de pequenos ruminantes ameaçadas de extinção.

As ovelhas Morada Nova em que a cérvix pode ser penetrada pelo dilatador de Hegar também puderam ser penetradas com um mandril / cateter de lavagem. Ambos os testes de penetração foram realizados após a sincronização do estro para selecionar animais adequados para NSER, após superestimulação hormonal (FONSECA et al., 2019). É importante lembrar que as ovelhas Morada Nova são a segunda raça de ovelha para a qual a coleta não cirúrgica teve sucesso em 100% dos animais, conforme relatado para ovelhas Lacaune superovuladas (FIGUEIRA et al., 2020c). Em estudos anteriores, a porcentagem de ovelhas sincronizadas que tiveram sucesso com a passagem do mandril / cateter foi menor em comparação com a penetrada com o dilatador de Hegar [5% nas ovelhas Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a), 3% nas ovelhas Dorper (DIAS et al., 2020), e em 40% nas ovelhas Santa Inês PRELLWITZ et al., 2019)]. As principais razões para a penetração cervical impedida ou incompleta em ovelhas são a falta de dilatação cervical suficiente e / ou problemas anatômicos que dificultam a visualização, clipagem ou retração da cérvix por um operador. Um alto grau de

desalinhamento do anel cervical pode ser tipicamente observado nas ovelhas que não podem ser penetradas com o dilatador de Hegar. No passado, algumas ovelhas penetradas com sucesso com o dilatador de Hegar não podiam ser penetradas com o mandril / cateter provavelmente porque este último é menos rígido em relação ao dilatador de Hegar (DIAS et al., 2020; PRELLWITZ et al., 2019).

Como esperado, o tratamento superovulatório neste estudo resultou em quase cinco vezes mais ovulações e produziu aproximadamente quatro vezes mais embriões viáveis em comparação com o regime de sincronização do estro. No entanto, uma vez que a penetração cervical e a lavagem uterina eram viáveis em ambos os subconjuntos de animais (SYNCH e SOV), é evidente que a recuperação embrionária pode ser realizada com sucesso em ovelhas sincronizadas ou superovuladas usando coleta não cirúrgica. A coleta de embriões de animais não superovulados pode ser a técnica de preferência em alguns casos, como por exemplo, devido ao custo menor ou disponibilidade de instalações de animais para alojar as ovelhas doadoras durante todo o período de administração do FSH. A coleta não cirúrgica é uma abordagem menos invasiva em comparação com a laparotomia e, portanto, é a melhor opção em termos de manutenção do bem-estar animal (OLIVEIRA et al., 2018; SANTOS et al., 2020). Protocolos simples de anestesia / analgesia e curto período de recuperação pós-tratamento tornam a coleta não cirúrgica uma alternativa válida aos procedimentos cirúrgicos para recuperação de embriões em pequenos ruminantes, especialmente durante os programas de conservação com número limitado de animais disponíveis. O procedimento não cirúrgico não requer jejum animal, pode ser realizado em menos de 30 minutos por técnicos experientes / treinados, e após o procedimento todas as ovelhas podem retornar imediatamente às suas condições de manejo ou rotina.

O relatório mais recente da FAO (Food and Agriculture Organization) sobre Produção Animal e Recursos de Saúde/ Criopreservação e Genética (F.A.O., 2012) não recomenda a coleta não cirúrgica para ovelhas e cabras. Isso foi amplamente baseado nos resultados de estudos anteriores, indicando que o este método foi menos eficaz em termos de taxas de recuperação embrionária e que os embriões coletados pelo método não cirúrgico resultaram em taxas de prenhez mais baixas por embrião transferido em comparação as obtidas com a transferência cirúrgica. No entanto, estudos mais recentes em ovelhas Santa Inês (FIGUEIRA et al., 2019; FONSECA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; PRELLWITZ et al., 2019; SANTOS et al., 2020), Dorper (DIAS et al., 2020) e Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a, 2020b), bem como em cabras leiteiras (FONSECA et al., 2013; MAIA et al., 2020) mostraram que: (1) na grande maioria das ovelhas sincronizadas ou em ovelhas e cabras

superovuladas, o método não cirúrgico resultou na recuperação de pelo menos um embrião viável; (2) a eficiência da lavagem e recuperação do embrião foi semelhante à obtida com a laparotomia; e (3) o método não cirúrgico é a técnica mais adequada em relação ao bem-estar animal (SANTOS et al., 2020). O presente estudo com ovelhas Morada Nova confirmou totalmente essas observações anteriores, relatando 85,7% ou 87,5% de ovelhas com pelo menos um embrião recuperado e uma média de 1,1 ou 3,9 embriões viáveis recuperados por ovelha doadora para animais sincronizados e superovulados, respectivamente. Finalmente, o relatório da FAO (F.A.O., 2012) também enfatizou os riscos de transmissão de doenças associadas à transferência de embriões. No entanto, o risco potencial de transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) foi reduzido com o uso de coleta e transferência por método não cirúrgico em comparação com a laparotomia, provavelmente devido ao fator de diluição do vírus 10 vezes maior [400 mL de meio de lavagem usado para coleta não cirúrgica vs. 40 mL de meio usada para lavagem laparoscópica (FONSECA et al., 2016; MARIA et al., 2015)]. Em suma, a coleta não cirúrgica parece fornecer soluções mais adequadas para outros genótipos de ovelhas e cabras ameaçadas de extinção, bem como para animais selvagens.

A qualidade do embrião é uma das principais preocupações durante a aplicação de certas técnicas de reprodução assistida. Nosso grupo reportou recentemente taxas de prenhez satisfatórias após a transferência de embriões tanto de frescos (FONSECA et al., 2018; MORAIS et al., 2020) quanto de criopreservados pelo método lento (FONSECA et al., 2018; FIGUEIRA et al., 2019) em pequenos ruminantes coletados por método não cirúrgico. O sucesso do congelamento lento também foi confirmado pela abordagem molecular para embriões de ovelha (BRAIR et al., 2020). Portanto, o protocolo de preservação de embriões usado no presente estudo foi baseado naquele desenvolvido originalmente para embriões de cabra e é atualmente usado para todas as raças de cabras e ovelhas sob a proteção do Biobanco de Embriões Brasileiros coordenado pela Embrapa.

3.7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que protocolos de sincronização de estro baseados em progesterona de curta, média ou longa duração podem ser aplicados de maneira eficiente para produção de embriões em ovelhas Morada Nova, e a coleta não cirúrgica pode ser utilizada na raça, em fêmeas sincronizadas e superovuladas, abrindo caminho para sua implementação em programas de conservação da biodiversidade.

**4 CAPÍTULO II – Artigo submetido ao periódico *Reproduction in Domestic Animals* -
Qualis (2013-2016) A2 – Medicina Veterinária**

**Um Estudo dos Fatores que Afetam a Produção e a Qualidade dos Embriões em Ovelhas
Morada Nova Superovuladas e Submetidas à Coleta de Embrião pelo Método Não
Cirúrgico**

*Maria Emilia Franco Oliveira^{1,2}; Aline Matos Arrais³; Marco Roberto Bourg de Mello³;
Gabriel Brun Vergani¹; Lucas Machado Figueira⁴, Sérgio Novita Esteves⁵; Verônica
Schinaider do Amaral Pereira⁵; Alexandre Rosseto Garcia⁵; Pawel Mieczyslaw Bartlewski⁶;
Jeferson Ferreira da Fonseca^{2*}*

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil;

²Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 4, CEP 62011000, Sobral, CE, Brazil;

³Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rodovia BR 465, km7, s/n, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil;

⁴Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Cep 24230-340, Niterói, RJ, Brazil;

⁵Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, Fazenda Canchim, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil;

⁶Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

*Correspondence: Jeferson Ferreira da Fonseca, Embrapa Caprinos e Ovinos, Rodovia MG 133, Km 42, Cep 36155-000, Coronel Pacheco – MG, Brasil. Tel: +55 32 3311-7484. Fax: +55 32 3249-4901. Email: jeferson.fonseca@embrapa.br

4.1 RESUMO

O presente estudo comparou os resultados da produção *in vivo* de embriões em 42 ovelhas Morada Nova em anestro submetidas a protocolo de indução e sincronização de estro com emprego de progesterona (P4) por 9 (G-9 dias) ou 12 dias (G-12 dias), seguido de tratamento superovulatório com doses decrescentes de hormônio folículo estimulante porcino (133 mg de pFSH administrados durante 3 dias em 6 doses). A técnica de recuperação embrionária pelo método não cirúrgico (NSER) foi realizada 6-7 dias após o início do estro comportamental. A contagem total de folículos (folículos antrais com diâmetro ≥ 2 mm contados com auxílio da ultrassonografia) dobrou entre a 1ª e a 6ª dose de pFSH em ambos os grupos de ovelhas ($P < 0,05$). As respostas ao estro não variaram entre os dois subconjuntos de ovelhas Morada Nova e foram em média 95,2%. Corpos lúteos (CL) foram detectados em 85,0% e 60,0% das ovelhas que apresentaram cio, respectivamente, nos grupos G-9 e G-12. A NSER foi concluída com sucesso em 86,2% de todas as ovelhas estudadas. O número médio de CLs por doadora e por doadora lavada com sucesso foi maior ($P < 0,05$) no G-12 ($12,3 \pm 1,7 / 12,1 \pm 1,9$) do que no G-9 ($7,9 \pm 1,4 / 8,2 \pm 1,6$). O número médio de blastocistos recuperados e de embriões viáveis foi maior ($P < 0,05$) para G-12 ($5,8 \pm 1,9$ e $3,7 \pm 1,7$) do que para G-9 ($3,5 \pm 1,1$ e $0,8 \pm 0,3$, respectivamente). A contagem total de folículos no momento da aplicação da 6ª dose de pFSH no grupo G-12 foi positivamente correlacionada ($P < 0,05$) com o número de CLs ($r = 0,95$) e de embriões viáveis ($r = 0,91$). As ovelhas com ≥ 10 CLs (48% de todas as doadoras submetidas a lavagem uterina) produziram 80,5% dos embriões viáveis. Em resumo: i) o protocolo de sincronização de estro baseado na utilização de P4 por 12 dias resultou em melhores resultados superovulatórios quando comparado ao protocolo de 9 dias; ii) a contagem total de folículos na última dose de pFSH foi um bom preditor de resposta superovulatória apenas nas ovelhas tratadas com P4 por 12 dias; e iii) animais com ≥ 10 ovulações são os principais contribuintes para a produção de embriões viáveis em ovelhas Morada Nova superovuladas.

Palavras-chave: produção de embriões *in vivo*, raça nativa, coleta de embrião não cirúrgica, NSER, superovulação.

4.2 ABSTRACT

We compared the outcomes of *in vivo* embryo production in 42 anestrous Morada Nova ewes subjected to either 9-day (G-9 Days) or 12 -day (G-12 Days) progesterone (P₄)-based estrus induction and synchronization protocol coupled with a decreasing-dose porcine follicle-stimulating hormone superovulatory treatment (133 mg of pFSH given over 3 days in 6 doses). Non-surgical embryo recovery (NSER) was performed 6-7 days after the onset of behavioral estrus. Total follicle count (ultrasonographically enumerated ovarian antral follicles ≥ 2 mm in diameter) doubled from the 1st to the 6th pFSH dose in both groups of ewes ($P < 0.05$). Estrus responses did not vary between the two subsets of Morada Nova sheep and they averaged 95.2%. Corpora lutea (CL) were detected in 85.0% and 60.0% of ewes going estrus in G-9 Days and G-12 Days groups, respectively. NSER was successfully completed in 86.2% of all ewes studied ($P > 0.05$). The mean number of CL per ewe/successfully flushed donor ewe was greater ($P < 0.05$) in G-12 Days ($12.3 \pm 1.7/12.1 \pm 1.9$) than in G-9 Days ($7.9 \pm 1.4/8.2 \pm 1.6$). Mean numbers of retrieved blastocysts and viable embryos were greater ($P > 0.05$) for G-12 Days (5.8 ± 1.9 and 3.7 ± 1.7) than for G-9 Days ewes (3.5 ± 1.1 and 0.8 ± 0.3 , respectively). The total follicle count at the time of the 6th pFSH dose in G-12 Days group was positively correlated ($P < 0.05$) with the number of CL ($r = 0.95$) and viable embryos ($r = 0.91$). The ewes with ≥ 10 CL (48% of all flushed donors) yielded 80.5% of viable embryos. In summary: i. the 12-day P₄-based estrus synchronization protocol resulted in better superovulatory outcomes than the 9-day protocol; ii. the total follicle count at the last pFSH dose was a good predictor of superovulatory responses only in the ewes primed with P₄ for 12 days; and iii. animals with ≥ 10 ovulations are the main contributors to viable embryo production in superovulated Morada Nova ewes.

Keywords: embryo production *in vivo*, native breed, non-surgical embryo recovery, NSER, superovulation.

4.3 INTRODUÇÃO

A Morada Nova é uma das raças ovinas naturalizadas brasileiras inscritas no programa de conservação de recursos genéticos (banco de germoplasma) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). No entanto, os relatos sobre superovulação e recuperação embrionária em ovelhas Morada Nova são escassos; apenas dois artigos descreveram a coleta cirúrgica de embriões em ovelhas Morada Nova de variedade branca (LOPEZ-JÚNIOR et al., 2006) e vermelha (BRASIL et al., 2016), e houve uma única tentativa de recuperação não cirúrgica de embriões (NSER) nesta raça (ARRAIS et al., 2021).

Na última década, o Brasil se tornou um líder mundial na aplicação comercial e na pesquisa da NSER em caprinos e ovinos (FONSECA et al., 2019b). Estudos comparativos têm demonstrado vantagens significativas da NSER, especialmente considerando as crescentes preocupações globais com o bem-estar animal, mas também devido à eficiência do método, que é maior ou comparável à da recuperação cirúrgica de embriões (OLIVEIRA et al., 2018a; SANTOS et al., 2020). A penetração cervical bem-sucedida seguida de lavagem uterina em ovelhas superovuladas foi relatada para várias raças ovinas no Brasil, incluindo Santa Inês (GUSMÃO et al., 2007; FONSECA et al., 2019c; OLIVEIRA et al., 2020), Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020a; FIGUEIRA et al., 2020b), Dorper (GUSMÃO et al., 2009; DIAS et al., 2020) e, mais recentemente, em ovelhas Morada Nova (ARRAIS et al., 2021).

Os tratamentos superovulatórios e os sistemas de produção de embriões *in vivo* desempenham um papel importante nas tecnologias contemporâneas de transferência de embriões e em programas de conservação (SOUZA-FABJAN et al., 2021). Uma grande preocupação em relação aos protocolos superovulatórios em ruminantes é a alta variabilidade dos resultados (ou seja, nas respostas ovarianas e na produção embrionária resultante) atribuídos a múltiplos fatores de influência extrínseca e intrínseca (BARTLEWSKI et al., 2016). A duração dos protocolos de sincronização do estro com dispositivos intravaginais de liberação de progesterona tem diferentes efeitos sobre o sucesso dos tratamentos superovulatórios em diferentes raças de ovelhas (MENCHACA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2020b). Enquanto o período de exposição à progesterona ou à progestágenos em ovelhas Merino (5 a 14 dias, MENCHACA et al., 2010) e Santa Inês (6,5 vs. 14,5 dias, OLIVEIRA et al., 2020) teve um efeito limitado na produção de embriões *in vivo*, o tratamento por um período de 9 dias com acetato de medroxiprogesterona foi associado a melhores resultados em comparação ao protocolo de curta duração (6 dias) em ovelhas Lacaune (FIGUEIRA et al., 2020b). Os resultados de um

estudo preliminar comparando a produção de embriões em ovelhas Morada Nova superovuladas e não superovuladas submetidas a protocolos de sincronização de estro à base de progesterona de durações variadas (6, 9 ou 12 dias) mostraram que os protocolos de 9 e 12 dias resultaram em melhores taxas de recuperação embrionária do que o regime de 6 dias (ARRAIS et al., 2021), mas um ensaio confirmatório ainda é necessário.

Vários estudos relataram que o número de pequenos folículos antrais (2-3 mm) no início da superovulação com hormônio folículo-estimulante (FSH) é um fator importante que determina o sucesso dos tratamentos superovulatórios em ovelhas (BARTLEWSKI et al., 2016). No entanto, o valor preditivo das contagens de folículos antrais na primeira dose exógena de FSH permanece ambíguo (BARTLEWSKI et al., 2016). Enquanto alguns estudos reportaram correlações positivas entre o número de pequenos folículos antrais (2-3 mm; BREBION e COGNIÉ, 1989) ou todos os folículos antrais detectáveis (≥ 2 mm de diâmetro; FIGUEIRA et al., 2020b) presentes no início do tratamento superovulatório com a produção embrionária resultante em ovelhas, outros estudos refutaram a existência de tais correlações (BARTLEWSKI et al., 2008b; ARRAIS et al., 2021). O número de corpos lúteos em ovelhas superovuladas é aproximadamente duas vezes o número de pequenos folículos antrais registrados no momento da primeira dose de FSH (BARTLEWSKI et al., 2015; ARRAIS et al., 2021), sugerindo que os folículos ovulatórios são recrutados ao longo do tratamento superovulatório de 3 ou 4 dias. Assim, a hipótese do presente estudo é de que o número de folículos antrais observado ao final do tratamento superovulatório com FSH é melhor preditor da resposta superovulatória e da produção embrionária subsequente em relação ao número registrado no momento da primeira injeção de FSH.

Um grande número de animais superovulados produz menos do que o número médio de embriões classificados como transferíveis (BARTLEWSKI et al., 2008a; FUERST et al., 2009; BARTLEWSKI et al., 2015). A obtenção de certo “limiar ovulatório” pode afetar negativamente a taxa de fertilização em ovelhas superovuladas. Um estudo conduzido em ovelhas Lacaune reportou uma diminuição significativa na produção de embriões transferíveis em animais doadores com mais de 30 ovulações (TORRÈS et al., 1987). Também é possível que alguns folículos de tamanho ovulatório no final do tratamento superovulatório em ovelhas tenham capacidade diminuída de ovular (BARTLEWSKI et al., 2008b; BARTLEWSKI et al., 2017). Portanto, resta determinar, para diferentes raças de ovelhas, se as fêmeas com maior resposta ovulatória produzem consistentemente mais embriões viáveis. Atualmente, não há uma classificação disponível para prever a taxa de produção de embriões viáveis em relação à resposta ovariana após superovulação em ovelhas.

Desta forma, o principal objetivo do presente estudo foi determinar se a duração do tratamento com progesterona (9 vs. 12 dias) teve influência no número de folículos antrais ovarianos e na produção de embriões em ovelhas Morada Nova superovuladas. Além disso, o rendimento e a qualidade dos embriões foram examinados para associações com o número de folículos antrais no início e no final do regime de pFSH superovulatório e comparados em grupos de ovelhas com diferentes respostas ovulatórias.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Condições gerais do experimento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Embrapa Pecuária de Leite (processo: 2512100516). O presente experimento foi realizado fora da estação reprodutiva (janeiro a fevereiro) em São Carlos, Brasil (latitude 22 ° 01'S, longitude 47 ° 54'W, altitude 850 m.a.s.l.). Quarenta e duas ovelhas multíparas clinicamente saudáveis e quatro carneiros da raça Morada Nova (variedade vermelha) foram utilizados neste estudo. Nenhum animal mostrou quaisquer sinais de anomalias reprodutivas detectáveis com exames ultrassonográficos e ginecológicos / andrológicos. Os animais foram mantidos em piquetes de *Panicum maximum* cv. Capim Aruana e receberam rações diárias de concentrado, de acordo com sua demanda nutricional. Sal mineral e água estavam disponíveis *ad libitum*.

4.4.2 Delineamento experimental

As ovelhas foram divididas por idade, peso e escore de condição corporal (ECC; 1 = magra a 5 = obesa) em dois grupos que receberam dispositivos intravaginais de silicone contendo 0,36 g de progesterona (Primer PR®, Tecnopec, São Paulo, SP, Brasil) por 9 dias (G-9; n = 21; idade média: 59,1 ± 4,1 meses, peso corporal médio: 41,7 ± 1,1 kg, e ECC médio: 3,3 ± 0,1) ou 12 dias (G-12; n = 21; idade média: 58,2 ± 4,1 meses, peso corporal médio: 43,7 ± 0,8 kg e ECC médio: 3,3 ± 0,1). Os dispositivos foram inseridos e retirados entre 17:00 e 18:00 horas. Todas as ovelhas receberam 133 mg de pFSH (Folltropin®, Vetoquinol, Mairiporã, Brasil) em seis doses decrescentes (25-25-15-15-10-10 % da quantidade total de pFSH) em intervalos de 12 horas, a partir de 60 horas antes da remoção do dispositivo de progesterona e injeções intramusculares de 37,5 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 50 µg de acetato de gonadorelina (Gestran®, Tecnopec, São Paulo, SP, Brasil) 12 horas antes e 36 horas após a remoção do dispositivo,

respectivamente. Além disso, três doses de 75 mg de flunixin meglumina (Flumax; JA Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) foram administradas por via intramuscular às 36, 60 e 84 horas após a injeção de acetato de gonadorelina para prevenir a regressão prematura do corpo lúteo (Fig. 3). As ovelhas foram superovuladas em grupos de 8 a 9 animais por dia durante cinco dias consecutivos. Após a retirada dos dispositivos de progesterona, o estro foi detectado duas vezes ao dia e as ovelhas foram direcionadas ao acasalamento com quatro carneiros férteis (no início do estro e 24 horas depois).

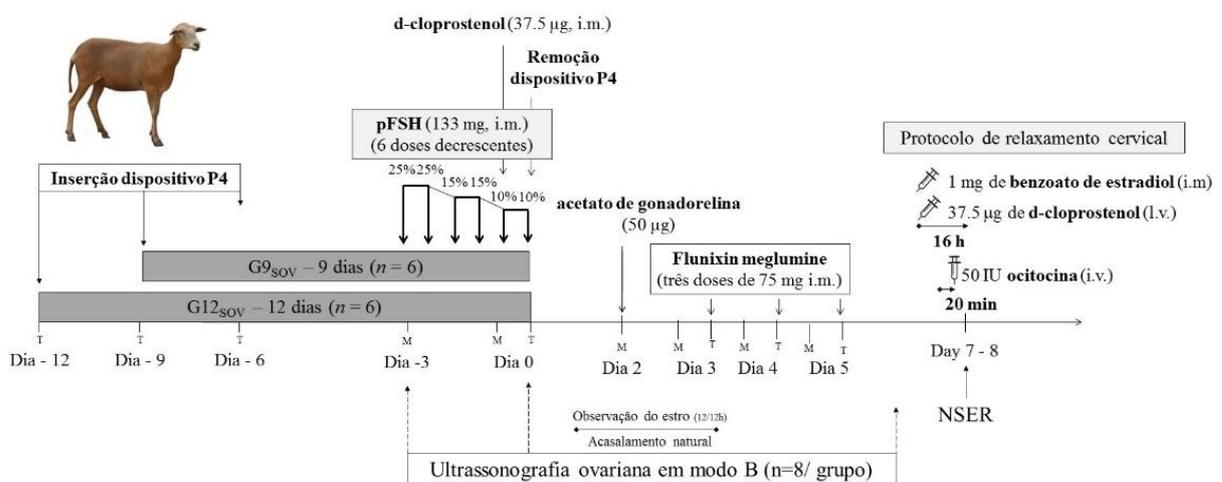


Figura 3. Representação esquemática dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar o efeito da duração (9 ou 12 dias) do pré-tratamento com progesterona em ovelhas Morada Nova superovuladas e submetidas à recuperação não cirúrgica de embriões (NSER). T= período da tarde; M= período manhã; P4 = dispositivo intravaginal contendo 0,36 g de progesterona; eCG = gonadotrofina coriônica equina; i.m. = intramuscular; i.v. = intravenosa; l.v. = latero-vulvar; IU – unidades internacionais.

4.4.3 Avaliação ultrassonográfica dos ovários

Os ovários foram digitalizados com um scanner portátil modo B (M5 Vet®, Mindray, Shenzhen, China) equipado com um transdutor transretal de 7,5 MHz adaptado para uso em pequenos ruminantes. Exames ultrassonográficos (n = 8 ovelhas por grupo) foram realizados 60 horas antes e no momento da remoção do dispositivo de progesterona (ou seja, no momento da primeira e da última dose superovulatória de pFSH) e 16 horas antes da recuperação dos embriões para determinar o número de folículos antrais ovarianos e de corpos lúteos (CL), respectivamente. Os folículos ovarianos foram agrupados nas seguintes classes de tamanho: Classe 1 (2,0 a 3,0 mm), Classe 2 (3,1 a 4,0 mm), Classe 3 (4,1 a 5,0 mm) e Classe 4 (> 5,0 mm de diâmetro). Em função do número de corpos lúteos presentes após o tratamento superovulatório, as doadoras também foram agrupadas em quatro classes: Classe 1 (≤ 3 CLs), Classe 2 (4 a 9 CLs), Classe 3 (10 a 15 CLs) e Classe 4 (> 15 CLs).

4.4.4. Procedimentos para coleta de embriões pela técnica não cirúrgica (NSER)

Todas as ovelhas acasaladas foram submetidas ao protocolo de dilatação cervical utilizando contenção física e química, conforme descrito anteriormente por Fonseca et al., (2019c). A NSER foi realizada 6 a 7 dias após o início do estro. A avaliação cervical, dessensibilização anestésica, clipagem e retração foram realizadas conforme descrito anteriormente por Arrais et al. (2021). Após a retração, dilatadores de Hegar (tamanhos 3 a 4) foram usados para atravessar a cervix. O “mapa cervical” representando a localização de todos os anéis cervicais (FONSECA et al., 2019c) e o tempo gasto para atravessar a cervix foram registrados. O dilatador de Hegar foi mantido no lugar por 30 segundos e depois removido, e um cateter estéril nº 8 equipado com um mandril de metal foi inserido e usado para atravessar os anéis cervicais. Cada corno uterino foi lavado separadamente com injeções e aspirações sucessivas de um total de 180 mL / corno de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril pré-aquecida a 37° C (mais 40 mL para lavar o aparelho de lavagem). Todas as estruturas recuperadas (não fertilizados e embriões) foram classificadas com base em seu estágio de desenvolvimento (de mórula não compacta a blastocisto expandido) e qualidade (grau 1 = excelente ou boa, grau 2 = razoável, grau 3 = pobre e grau 4 = morta ou degenerada) conforme detalhado no manual da IETS - International Embryo Technology Society (STRINGFELLOW & GIVENS, 2010). Todos os embriões classificados de grau 1 a

3 foram considerados embriões viáveis ou transferíveis, enquanto os graus 1 e 2 foram classificados como embriões congeláveis.

4.4.5. Variáveis e análise estatística

Os seguintes dados foram registrados 60 horas antes e no momento de remoção da esponja de MAP (no momento da primeira e da sexta injeção de pFSH, respectivamente): porcentagem de ovelhas com folículos antrais de tamanho ovulatório (≥ 5 mm de diâmetro); diâmetro do maior folículo (mm); contagem total de folículos e número de folículos em diferentes classes de tamanho. Posteriormente, foram registradas ou calculadas as seguintes variáveis: número de ovelhas em estro; momento do início do estro comportamental (em horas, tempo desde a remoção do dispositivo até a detecção do estro); duração do estro (em horas); número de CL por ovelha às 16 horas antes da NSER; proporções de ovelhas de acordo com classes de contagem de CLs; porcentagem de ovelhas com corpos lúteos um dia antes da NSER; porcentagem de ovelhas penetradas e lavadas com sucesso; duração da penetração cervical com Hegar ou mandril / cateter; pontuação de tempo para passagem do Hegar ou penetração do mandril / cateter (Pontuação 1: penetração cervical muito fácil, alcançada em menos de 1 minuto; Pontuação 2: fácil / entre 1 e 3 minutos; Pontuação 3: dificuldade moderada / tempo entre 3 e 7 minutos; Pontuação 4: difícil passagem / tempo entre 7 e 10 minutos; e Pontuação 5: impossível penetrar o colo do útero ou falta de passagem cervical completa); duração do procedimento de lavagem uterina (em minutos, tempo desde a inserção do cateter de lavagem até sua remoção); duração do procedimento da NSER (em minutos, tempo desde a anestesia peridural até a remoção do cateter / liberação cervical; eficiência de recuperação de fluido (volume de fluido recuperado / fluido total infundido \times 100%); taxa de recuperação (número de estruturas recuperadas / número de CLs contados \times 100 %); viabilidade embrionária (número de embriões viáveis recuperados / número de estruturas recuperadas \times 100%); número total de óvulos / embrião recuperado por ovelha; número de embriões viáveis (embriões grau 1 a 3; segundo STRINGFELLOW e GIVENS, 2010) recuperados por ovelha; número de embriões congeláveis (embriões grau 1 e 2) recuperados por ovelha; número de embriões degenerados por ovelha; número de zona pelúcida vazia (sem a presença de massa embrionária) recuperada por ovelha; número de mórulas (não compactas e compactas) e blastocistos (inicial, expandido e eclodido); número total de mórulas e blastocistos recuperados; porcentagem de ovelhas com embriões

recuperados; porcentagem de ovelhas com embriões viáveis recuperados; e porcentagem de ovelhas com mais do que o número médio de embriões / embriões viáveis por doadora.

As análises estatísticas foram realizadas com o software SAS® versão 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, EUA). As proporções foram comparadas usando um teste de qui-quadrado (fórmula de Brendt-Snedecor para análise de proporções), e os dados numéricos ovarianos e superovulatórios foram analisados usando análise de variância bidirecional (ANOVA) para determinar os principais efeitos dos grupos de tratamento, tempo e suas interações. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (SEM), a menos que seja indicado o contrário. Correlações de Pearson foram calculadas entre variáveis quantitativas. As diferenças foram consideradas significativas em $P < 0,05$.

4.5 RESULTADOS

Os dados sobre as populações de folículos antrais estão apresentados na Tabela 5. A proporção de ovelhas com folículos de tamanho ovulatório ($\geq 5,0$ mm de diâmetro), o diâmetro do maior folículo, o número total de folículos antrais detectáveis, bem como o número da Classe 2 (3,1 a 4,0 mm), Classe 3 (4,1 a 5,0 mm) e Classe 4 ($> 5,0$ mm de diâmetro) de folículos antrais aumentou ($P < 0,05$), enquanto o número da Classe 1 (2,0 a 3,0 mm) diminuiu ($P < 0,05$) do momento da primeira até a última dose de pFSH em ambos os grupos de ovelhas estudadas (G-9 e G-12). O número de folículos Classe 3 no momento da 6ª dose de pFSH foi maior ($P < 0,05$) em ovelhas do G-9 em comparação com as do G-12. Nem o número total de folículos antrais (todos os folículos ≥ 2 mm de diâmetro) nem o número de folículos em diferentes classes de tamanho detectados pelo ultrassom no momento da primeira injeção de pFSH foram correlacionados com as respostas superovulatórias. Em ovelhas do G-12, o número de folículos de 3,1 a 4,0 mm no momento da 6ª dose de pFSH foi positivamente correlacionado com o número de CL ($r = 0,90$; $P < 0,01$), e o número total de folículos antrais foi positivamente correlacionado com o número de CL ($r = 0,95$; $P < 0,01$) e de embriões viáveis ($r = 0,91$; $P < 0,05$). Nenhuma correlação entre o número de folículos antrais e a produção de embriões foi registrada nos animais do G-9.

Tabela 5. Parâmetros (% ou média \pm SEM) relacionados à população de folículos antrais determinados por ultrassonografia no momento da 1^a (60 h antes da remoção do dispositivo) e 6^a (no momento da remoção do dispositivo) dose de pFSH em ovelhas Morada Nova que foram submetidas a pré-tratamento com progesterona por 9 (G9) ou 12 dias (G12).

Variáveis	G-9		G-12	
	1 ^a pFSH	6 ^a pFSH	1 ^a pFSH	6 ^a pFSH
Ovelhas com folículos \geq 5 mm (%)	12,5 ^b (1/8)	87,5 ^a (7/8)	25,0 ^b (2/8)	75,0 ^a (6/8)
Diâmetro do maior folículo (mm)	4,4 \pm 0,3 ^b	5,6 \pm 0,2 ^a	4,3 \pm 0,4 ^b	5,8 \pm 0,4 ^a
Número de folículos:				
Classe 1 (2,0 to 3,0 mm)	4,4 \pm 1,2 ^a	2,0 \pm 0,6 ^b	4,4 \pm 1,1 ^a	2,8 \pm 0,5 ^b
Classe 2 (3,1 to 4,0 mm)	0,9 \pm 0,2 ^b	3,6 \pm 1,0 ^a	1,4 \pm 0,4 ^b	4,9 \pm 1,0 ^a
Classe 3 (4,1 to 5,0 mm)	0,9 \pm 0,3 ^b	4,0 \pm 0,8 ^{aA}	0,3 \pm 0,2 ^b	2,6 \pm 0,7 ^{aB}
Classe 4 (> 5,0 mm)	0,1 \pm 0,1 ^b	2,0 \pm 0,7 ^a	0,3 \pm 0,2 ^b	1,4 \pm 0,4 ^a
Contagem total de folículos	6,3 \pm 1,1 ^b	11,6 \pm 1,1 ^a	6,3 \pm 0,9 ^b	11,6 \pm 0,8 ^a

Os valores com diferentes letras sobscritas diferiram ($P < 0,05$): ab dentro de cada grupo de sincronização do estro; AB dentro dos tempos da dose de pFSH entre os grupos.

Uma ovelha perdeu o dispositivo intravaginal e não apresentou sinais de estro. Além disso, uma ovelha de cada grupo também não apresentou sinais de estro. O início do estro comportamental ocorreu entre 24 e 36 horas após a remoção dos dispositivos liberadores de progesterona em 85% (17/20) das ovelhas do G-9 e em todas (20/20) as ovelhas do G-12. Três ovelhas do grupo G-9 entraram em estro 12, 48 e 72 horas após a remoção do dispositivo. O estro começou mais cedo ($P < 0,05$) nas ovelhas do G-12 em comparação com ovelhas do G-9 (Tabela 6). Estruturas embrionárias só puderam ser recuperadas nas ovelhas em cio entre 24 e 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona.

Onze das 40 ovelhas (27,5%) com sinais de estro comportamental não apresentaram CL no dia anterior a NSER e, portanto, não foram submetidas à lavagem uterina. Todas as ovelhas que não foram submetidas à lavagem uterina foram classificadas com escore 4 (7 a 10 min) para tentativa de penetração de Hegar e escore 5 (não penetrado) para inserção de mandril / cateter. As respostas superovulatórias e os dados da coleta de embriões estão apresentados na Tabela 6. O número de CLs por ovelha e por ovelha submetida à lavagem, o número de não fertilizados / embriões, o número de embriões viáveis e o número total de blastocistos foram todos maiores ($P < 0,05$) nas fêmeas do G-12 em comparação as do G-9.

Tabela 6. Variáveis analisadas (% ou média \pm SEM) em ovelhas Morada Nova submetidas a protocolo de sincronização de estro de 9 (G-9) ou 12 dias (G-12), superovulação com 133 mg de pFSH e recuperação embrionária pela técnica não cirúrgica (NSER), 6 a 7 dias após o início do estro.

Variáveis	G-9	G-12
Resposta ao estro (%)	100,0 (20/20)	95,2 (20/21)
Intervalo ao estro (h)	30,4 \pm 3,3 ^a	26,0 \pm 1,3 ^b
Duração do estro (h)	36,0 \pm 2,9	33,0 \pm 3,9
Ovelhas com CL um dia antes da NSER (%)	85,0 (17/20)	60,0 (12/20)
Número de CLs por ovelha	7,9 \pm 1,4 ^b	12,3 \pm 1,7 ^a
Ovelhas penetradas e lavadas com sucesso (%)	82,3 (14/17)	91,6 (11/12)
Duração da penetração cervical por Hegar (min)	2,9 \pm 0,5	3,5 \pm 0,9
Duração da penetração cervical por catheter (min)	3,3 \pm 0,9	1,4 \pm 0,3
Duração do procedimento de lavagem uterina (min)	19,9 \pm 1,6	23,4 \pm 2,6
Duração do procedimento de NSER (min)	28,6 \pm 1,2	31,4 \pm 2,2
Eficiência da recuperação de líquido (%)	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
Número de CLs por ovelha coletada	8,2 \pm 1,6 ^b	12,1 \pm 1,9 ^a
Taxa de recuperação (%)	70,4 (81/115)	71,4 (95/133)
Viabilidade embrionária (%)	60,5 (49/81)	67,4 (64/95)
Número total de estruturas (embriões e não fertilizados)	5,8 \pm 1,3 ^b	8,6 \pm 1,8 ^a
Número de estruturas não fertilizadas	1,7 \pm 0,8	1,9 \pm 0,6
Número de embriões degenerados	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2
Número de zonas pelúcidas vazias	0,5 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0
Número de mórulas não compactas	0,6 \pm 0,5	0,3 \pm 0,2
Número de mórulas compactas	2,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0,7
Número total de mórulas	2,7 \pm 1,2	2,1 \pm 0,7
Número de blastocistos iniciais	0,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,9
Número de blastocistos	0,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1
Número de blastocistos expandidos	0,1 \pm 0,1	1,5 \pm 1,4
Número de blastocistos eclodidos	0,1 \pm 0,1	-
Número total de blastocistos	0,8 \pm 0,3 ^b	3,7 \pm 1,7 ^a
Número de embriões viáveis (graus 1, 2 e 3)	3,5 \pm 1,1 ^b	5,8 \pm 1,9 ^a
Número de embriões congeláveis (graus 1 e 2)	3,3 \pm 0,9	4,9 \pm 1,2
Ovelhas com estruturas recuperadas (%)	78,6 (11/14)	100,0 (11/11)
Ovelhas com embriões viáveis recuperados (%)	64,3 (9/14)	81,8 (9/11)
Ovelhas com número de embriões viáveis recuperados acima da média (%)	57,1 (8/14)	45,5 (5/11)

CL = corpo lúteo.

() Número de animais ou de estruturas recuperadas.

^{a,b} Valores com letras sobrescritas diferentes dentro da mesma linha apresentam diferença estatística ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa no número de animais alocados nas diferentes classes de CL entre os dois grupos de ovelhas estudados ($P > 0,05$). Quando os dados foram agrupados para todos os animais estudados, quase metade das doadoras (48%) tinha mais de 10 CLs um dia antes da NSER e produziu 80,5% de todos os embriões viáveis (Fig. 4A). A avaliação retrospectiva revelou que 10 ovulações foi um ponto de corte no qual a diferença significativa na porcentagem de embriões viáveis foi observada. A porcentagem de embriões

viáveis foi maior ($P < 0,05$) para ovelhas com mais de 10 CLs do que para ovelhas com menos de 10 CLs em ambos os grupos de sincronização de estro (G9 e G 12) conforme mostrado na Figura 4B.

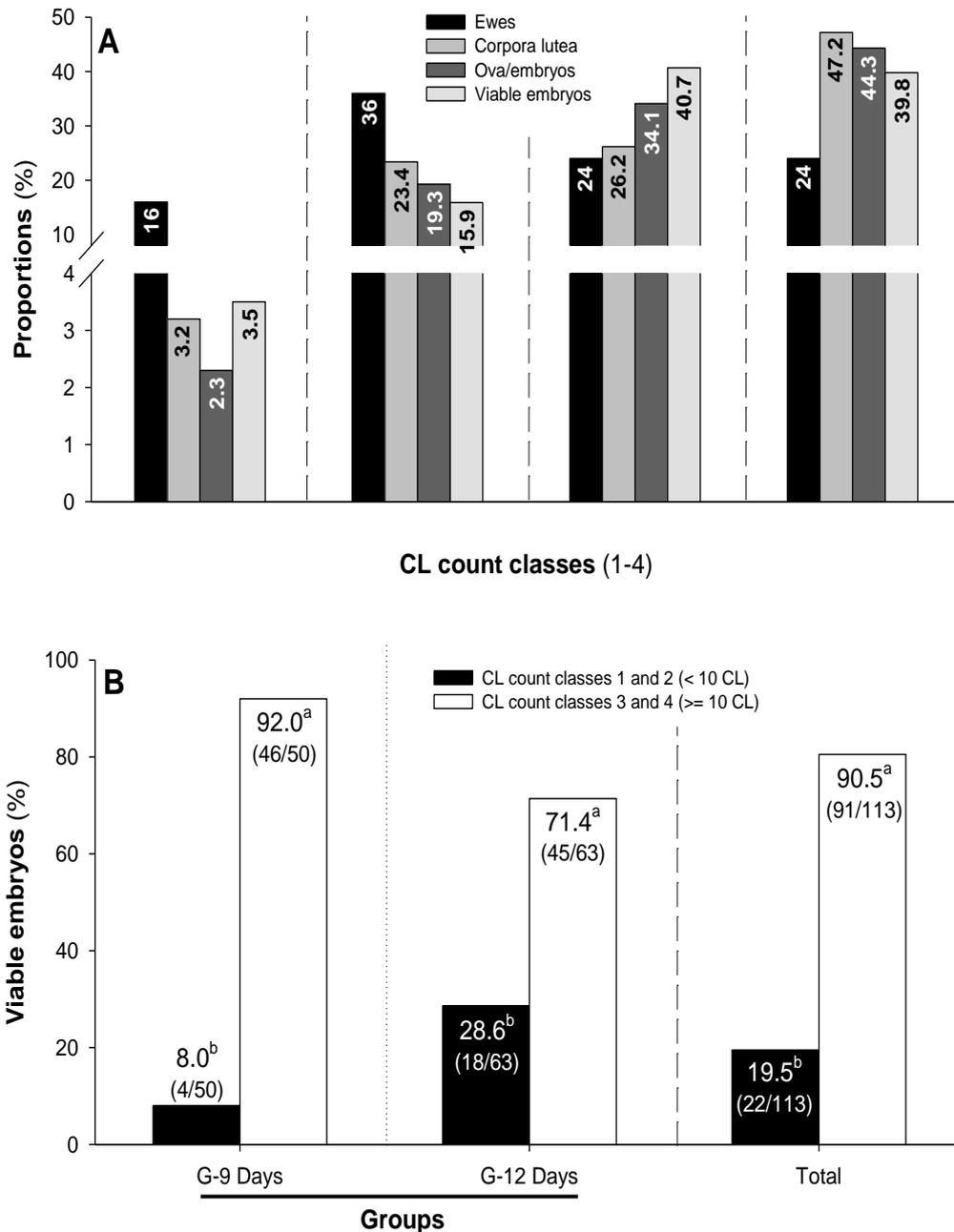


Figura. 4. (A) Porcentagem de ovelhas, corpos lúteos (CL), estruturas não fertilizadas/embriões e embriões viáveis para cada classe de contagem de CL determinada por ultrassonografia em doadoras Morada Nova antes da coleta não cirúrgica de embriões (NSER). (B) Porcentagens de embriões viáveis (graus 1, 2 e 3) de doadoras Morada Nova com número superior ou inferior a 10 corpos lúteos (CL) um dia antes da NSER após serem submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro à base de progesterona (G-9 e G-12)

4.6 DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou a adequação da técnica de recuperação embrionária não cirúrgica (NSER) para ovelhas Morada Nova superovuladas. As ovelhas doadoras que haviam sido submetidas à sincronização de estro com dispositivo liberador de progesterona por 12 dias produziram mais embriões viáveis e apresentaram maior proporção de blastocistos do que as ovelhas pré-tratadas com progesterona durante 9 dias. Também foi confirmada a hipótese de que o número de folículos antrais no momento da última dose superovulatória de pFSH (mas não aqueles no início do tratamento superovulatório) é indicativo da produção total de embriões. O número de folículos antrais Classe 2 (de 3,1 a 4,0 mm de diâmetro) e de todos os folículos ≥ 2 mm de tamanho presentes na última dose de pFSH foram apenas correlacionados com respostas superovulatórias em ovelhas que receberam dispositivos intravaginais de liberação de progesterona por 12 dias. Por fim, das ovelhas que responderam à superovulação (ou seja, tiveram CL no dia anterior à retirada do embrião), aquelas que apresentaram mais de 10 CLs pós-tratamento produziram 80,5% dos embriões viáveis.

A contagem total dos folículos antrais, bem como o número de folículos antrais em diferentes categorias de tamanho registrado 60 horas antes da remoção do dispositivo intravaginal (1ª dose de pFSH) não foram correlacionadas com as respostas ovarianas e à produção de embriões em ovelhas Morada Nova superovuladas. Claramente, não houve relação linear entre o número de folículos antrais no início do tratamento com pFSH e as respostas superovulatórias, sugerindo que os folículos ovarianos podem ser recrutados para crescer e ovular durante toda a duração da estimulação hormonal ovariana. Resta ser determinado em que momento do tratamento superovulatório, o maior número de futuros folículos ovulatórios são estimulados a crescer. No entanto, os resultados do presente estudo indicam que a avaliação ultrassonográfica das populações foliculares no momento da última dose de pFSH é um preditor preciso da resposta superovulatória em ovelhas Morada Nova, no entanto, apenas para ovelhas tratadas com progesterona durante 12 dias. É possível que tal relação diminua com o atraso do início do estro (ocorreu em média 4 horas mais tarde em ovelhas do G-9 em relação às fêmeas do grupo G-12) embora a razão específica para esta diferença entre os dois grupos de ovelhas Morada Nova ainda precisa ser elucidada.

Um maior número de corpos lúteos, de estruturas não fertilizadas/embriões e de embriões viáveis foram observados em ovelhas pertencentes ao G-12 em comparação às fêmeas do G-9. Uma vez que o número de folículos antrais no momento da 1ª e 6ª dose de pFSH não variou entre os dois grupos de ovelhas, a diferença nas taxas de ovulação está

provavelmente relacionada à responsividade folicular à secreção pré-ovulatória de LH (VEIGA-LOPEZ et al., 2006). As concentrações circulantes de progesterona (P4) diminuem gradualmente de um dia após a inserção do dispositivo intravaginal de liberação de progesterona até o dia de sua remoção (OLIVEIRA et al., 2016). Portanto, é possível que a progesterona liberada pelo dispositivo durante o tratamento com pFSH (isto é, do dia 10 ao dia 12 ou do dia 7 ao dia 9) tenha sido menor nas ovelhas G-12 em comparação com os animais do G-9; embora não tenham sido medidas as concentrações séricas de P4 nas ovelhas do presente estudo. Em bovinos, concentrações mais baixas de P4 no final do metaestro e no proestro estão associadas a uma maior frequência de pulso de LH (ABREU et al., 2018), e o LH regula positivamente a expressão de seus receptores e várias proteínas ligadas à proliferação e funcionalidade das células foliculares (LUO et al., 2011). O mesmo mecanismo pode ser responsável pela menor capacidade estrogênica das células foliculares e do início tardio do estro nas ovelhas do G-9. Portanto, no momento do pico de LH induzido pelo acetato de gonadorelina, os folículos das ovelhas Morada Nova submetidas ao protocolo de sincronização de estro de 12 dias podem ter adquirido maior capacidade ovulatória em comparação aos folículos das ovelhas pré-tratadas com P4 por 9 dias.

Em relação à qualidade embrionária, apenas 60 % (G-9) e 67 % (G-12) de todas as estruturas recuperadas foram classificadas como embriões viáveis (graus 1, 2 e 3). Essas proporções de embriões viáveis são semelhantes às relatadas em estudos anteriores em Morada Nova (G-9, 60,0 % e G-12, 70,5 %, respectivamente; ARRAIS et al., 2021) e Lacaune (G-9, 62,7 %; FIGUEIRA et al., 2020b) usando a mesma estratégia de acasalamento e o mesmo protocolo de superovulação (133 mg de pFSH em doses diárias decrescentes). Em outro estudo, ovelhas Morada Nova produziram 46,9 % (68/145) de embriões viáveis após 14 dias de protocolo de progesterona e 133 mg de pFSH seguido de inseminação laparoscópica realizada 50 horas após a remoção do dispositivo (BRASIL et al., 2016). Maiores taxas de viabilidade embrionária foram observadas em ovelhas Lacaune acasaladas manualmente e que tinham sido submetidas a tratamento com progesterona por 9 dias associado a 100 ou 200 mg de pFSH (~80 %; FIGUEIRA et al., 2020d) assim como em ovelhas Morada Nova tratadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) por 14 dias e 200 UI de pFSH (86 a 89 % de viabilidade embrionária; LOPEZ JÚNIOR et al., 2006). Assim, a estratégia de acasalamento não parece ser o principal motivo para a falha na fertilização e / ou diminuição da qualidade do embrião. Outros fatores, incluindo a competência oocitária e o ambiente materno (oviduto e cornos uterinos), podem estar envolvidos. Em relação ao estágio de desenvolvimento, as ovelhas alocadas ao grupo G-12 produziram mais blastocistos do que aquelas do grupo G-9.

Este fato é particularmente importante quando consideramos a possibilidade da transferência de embriões a fresco, mas também pela possível interferência do estágio embrionário no sucesso da criopreservação e na criação de bancos de germoplasma (FONSECA et al., 2018; GIBBONS et al., 2019; MORAIS et al., 2020).

Com base na detecção ultrassonográfica de corpos lúteos, 80,5 % dos embriões viáveis foram recuperados de ovelhas que apresentavam mais de 10 CLs após o tratamento superovulatório (48 % das ovelhas submetidas à lavagem uterina). Embora, para fins de conservação e formação de banco de germoplasma, a recuperação de embriões possa ser realizada em doadoras com resposta fraca ou até mesmo em ovelhas não superovuladas (ARRAIS et al., 2021), os programas comerciais de ovulação múltipla e transferência de embriões (MOET) requerem a eliminação de animais que não contribuem significativamente para uma produção final de embriões viáveis. Conforme reportado por Oliveira et al. (2018b), a identificação ultrassonográfica de estruturas lúteas em ovelhas superovuladas fornece uma ferramenta valiosa para selecionar as melhores doadoras antes da lavagem uterina ou da recuperação laparoscópica. No presente estudo, o ponto de corte de 10 ovulações por ovelha poderia ser economicamente justificado, mas critérios semelhantes para outras raças de ovinos e protocolos de superovulação ainda precisam ser determinados.

Este é o segundo estudo utilizando a abordagem transcervical para recuperação embrionária em ovelhas Morada Nova. Agora há evidências suficientes para sugerir que a NSER é uma técnica válida para recuperação de embriões em várias raças de ovelhas. A taxa média de sucesso deste método excede 80 % (proporção de ovelhas penetradas e lavadas com sucesso) com a taxa de recuperação de 70 % (todas as estruturas recuperadas), e a duração total do procedimento realizado por um operador treinado em média 30 minutos (FONSECA et al., 2019c; PRELLWITZ et al., 2019; ARRAIS et al., 2021). As coletas transcervicais (NSER) podem ser realizadas no próprio curral com as ovelhas sendo submetidas à lavagem uterina na companhia de outros animais do rebanho (diminuição do nível de estresse) e, em seguida, retornando rapidamente à sua rotina (comida e bebida), sem qualquer perturbação devido aos procedimentos anestésicos e cirúrgicos (FONSECA et al., 2019d). Nenhum jejum anterior é necessário também. Assim, além de sua eficiência, o uso da NSER é uma excelente resposta às preocupações com o bem-estar animal (MARTIN & KADOKAWA, 2006) que promete substituir a laparotomia convencional ou as técnicas laparoscópicas para a recuperação de embriões ovinos produzidos *in vivo*.

4.7 CONCLUSÕES

A sincronização de estro à base de progesterona por 12 dias em combinação com o tratamento superovulatório de pFSH e recuperação embrionária não cirúrgica em ovelhas Morada Nova cíclicas foi associada com um início mais precoce do estro e maiores respostas superovulatórias / produção embrionária em comparação com o protocolo de sincronização de estro de 9 dias. O número de corpos lúteos e a produção de embriões (tanto o número total de blastocistos, bem como o número de embriões viáveis) podem ser previstos a partir do número total de folículos acima de 2 mm de diâmetro avaliados no momento da última dose de pFSH nas ovelhas pré-tratadas com progesterona por 12 dias. Aproximadamente 85% de todos os embriões viáveis foram recuperados de ovelhas que tiveram mais que 10 ovulações / CL detectado por ultrassonografia (48% das ovelhas submetidas à lavagem uterina). A técnica NSER tem se mostrado um método útil para a recuperação de embriões em ovelhas Morada Nova.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo mostraram que a técnica de lavagem uterina pela via não cirúrgica cervical é segura e eficiente para recuperação de embriões produzidos in vivo em ovelhas Morada Nova abrindo caminho para sua implementação em programas de conservação da biodiversidade. Também foi possível mostrar que protocolos de sincronização de estro baseados em progesterona de curta, média ou longa duração (6, 9 ou 12 dias, respectivamente) podem ser aplicados de maneira eficiente para produção de embriões em ovelhas Morada Nova submetidas à coleta não cirúrgica. Adicionalmente, foi possível verificar também que a avaliação ultrassonográfica da quantidade de folículos acima de 2 mm de diâmetro no momento da última dose de pFSH nas ovelhas pré-tratadas com progesterona por 12 dias pode ser usado como preditor da resposta superovulatória e da produção de embriões.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, n.3-4, p.173-179, 2012.
- ABREU, F.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; CRUPPE, L.H.; MUSSARD, M.L.; BRIDGES, G.A.; HARSTINE, B.R.; SMITH, G.W.; GEARY, T.W.; DAY, M.L. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. **Animal Reproduction Science**, v.196, p.59-68, 2018.
- ALBUQUERQUE, M.S.M.; IANELLA, P. Inventário de Recursos Genéticos Animais da Embrapa. Brasília-DF, Embrapa, 2016.
- ALDERSON, L. Breeds at risk: Definition and measurement of the factors which determine endangerment. **Livestock Science**, v.123, n.1, p.23-27, 2009.
- ALMEIDA, V.M.; CÂMARA, D.R.; SALLES, H.O.; OLIVEIRA, D.P.F.; MEDEIROS, J.N.; ALVES, O.M.M. Colheita de embriões por via transcervical em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p. 82-84, 2002.
- AMIRIDIS, G.S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.152- 161, 2012.
- AMIRIDIS, G.S., REKKAS, C.A., FTHENAKIS, G.C., VAINAS, E., LYMBEROPOULOS, A., CHRISTODOULOU, V., BELIBASAKI, S. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. **Theriogenology**, v.57, p.1143-1150, 2002.
- ARCO – ASSISTÊNCIA AOS REBANHOS DE CRIADORES DE OVINOS. Raça Morada Nova. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/index.php>. Acesso em: 31 mar 2021.
- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.31-42, 1983.
- ARRAIS, A.M.; MELLO, M.R.B.; VERGANI, G.B.; FIGUEIRA, L.M.; ESTEVES, S.N.; PEREIRA, V.S.A.; BARTLEWSKI, P.M.; OLIVEIRA, M.E.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; FONSECA, J.F. Non-Surgical Embryo Recovery from Estrus-Synchronized or Superovulated Morada Nova ewes: A Feasible Strategy for Embryo Bank Formation. **Biopreservation and Biobanking**, v.00, n.00. 2021. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0125>
- ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of Neuroendocrinology**, v.26, n.6, p.356-369, 2014.
- BALARO, M.F.; FONSECA, J.F.; BARBOSA, T.G.; SOUZA-FABJAN, J.M.; FIGUEIRA, L.M.; TEIXEIRA, T.A.; CARVALHEIRA, L.R.; BRANDÃO, F.Z. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the superovulatory Day 0 protocol. **Domestic Animal Endocrinology**, v.54, p.10-4, 2016.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P., 1995. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras (FAO, Roma).

BARTLEWSKI, P.M.; ALEXANDER, B.D.; KING, W.A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anoestrous ewes. **Small Ruminant Research**, v.75, p.210–216, 2008a.

BARTLEWSKI, P.M., ALEXANDER, B.D., RAWLINGS, N.C., BARRETT, D.M.W. AND KING, W.A. Ovarian responses, hormonal profiles and embryo yields in anoestrous ewes superovulated with Folltropin®-V after pretreatment with medroxyprogesterone acetate (MAP)-releasing vaginal sponges and a single dose of oestradiol-17 β (E2-17 β). **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.299-307, 2008b.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; CHAPMAN, C.L.; NELSON, M.L.; PALMER, B.; ARAVINDAKSHAN, L.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ovarian responses in GnRH-treated anoestrous ewes: Follicular and endocrine correlates with luteal outcome. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, n.2-3, p.133–142, 2001.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.111–124, 1999.

BARTLEWSKI, P.M.; CANDAPPA, I.B.R. Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. **Theriogenology**, v.84, n.9, p.1594–1602, 2015.

BARTLEWSKI, P.M.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; OLIVEIRA, M.E.F. Effect of altering the intervals between consecutive superovulatory doses of porcine follicle-stimulating hormone on ovarian responses and embryo yields in anestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v.180, p.44-49, 2017.

BARTLEWSKI, P.M.; SEATON, P.; OLIVEIRA, M.E.F.; KRIDLI, R.T.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v.86, p.130–143, 2016.

BARTLEWSKI, P.M.; SEATON, P.; SZPILA, P.; OLIVEIRA, M.E.F.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; KRIDLI, R.T.; ZIEBA, D.A. Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 β on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in cyclic ewes superovulated in the multiple-dose Folltropin-V (porcine FSH) regimen. **Theriogenology**, v.84, p.1225-1237, 2015.

BOETTCHER, P.J.; STELLA, A.; PIZZI, F.; GANDINI, G. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. **Genetics Selection Evolution**, v.37, p.657–675, 2005.

BRAIR, V.L.; MAIA, A.L.R.S.; CORREIA, L.F.L.; BARBOSA, N.O.; SANTOS, J.D.R.; BRANDÃO, F.Z.; FONSECA, J.F.; BATISTA, R.I.T.P.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. **Cryobiology**, v.5, p.110–115, 2020.

BRASIL, O.O.; MOREIRA, N.H.; SILVA, T.A.S.N.; SILVA, B.D.M.; NASCIMENTO, N.V.; FACÓ, O.; RAMOS, A.F. Embryo production in Morada Nova and Somalis Brasileira sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.5, p.1390–1394, 2016.

BREBION, P.; COGNIÉ, Y. Increased superovulation in the Ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. In: **Proceedings of the 5th meeting on European Embryo Transfer Association**. Lyon, France: EETA'89; 106e106, 1989.

CABROL, D.; DUBOIS, P.; SEDBON, E.; DALLOT, E.; LEGAGNEUX, J.; AMICHOT, G.; CEDARD, L.; SUREAU, C. Prostaglandin E2-induced changes in the distribution of glycosaminoglycans in the isolated rat uterine cervix. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v.26, n.4, p.359–365, 1987.

CARVALHO-DE-PAULA, C.J.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; GONÇALVES, J.D.; DIAS, J.H.; SOUZA, G.N.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F. Effect of a 12-h increment in the short-term treatment regimen on ovarian status, estrus synchrony, and pregnancy rate in artificially inseminated dairy goats. **Animal Reproduction Science**, v.221, e106571, 2020.

COMIZZOLI, P. Biotechnologies for wildlife fertility preservation. **Anim Front**, v.5, p.73–78, 2015.

COONROD, S.A.; COREN, B.R.; MCBRIDE, B.L.; BOWEN, M.J.; KRAEMER, D.C. Successful non-surgical collection of ovine embryos. **Theriogenology**, v.2, p.149, 1986 (Resumo).

DIAS, F.E.F.; JUNIOR, E.S.L.; VILLAROEL, A.B.S.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.618-623, 2001.

DIAS, J.H.; PUPIN, M.A.; DUARTE, G.S.; BRAIR, V.L.; PAULA, C.J.C.; BATISTA, R.I.T.P.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F. Successful transcervical uterine flushing can be performed without or reduced dose of estradiol benzoate in cervical relaxation protocol in Dorper ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.55, n.7, p.844–850, 2020.

DOMINGUES, O. Carneiro deslanado de Morada Nova. **Boletim da Sociedade de Brasileira de Agronomia**, v. 4, n. 1, p. 122, 1941.

EHLING, V.C.; NIEMANN, H. Anlage Von Genomreserven beim schaf Unter Besonderer Berücksichtigung biotechnologischer Methoden. **Forschungsbereich Biotechnologie**, v.72, p.140–152, 2000.

ENGELS, J.M.; FASSIL, H. Plant and Animal Genebanks. **Diversity**, p.1–34, 1999.

EVANS, A.C.; DUFFY, P.; CROSBY, T.F.; HAWKEN, P.A.; BOLAND, M.P.; BEARD, A.P. Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronisation and fertility during the breeding season in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.3-4, p.349-58, 2004.

FACÓ, O.; PAIVA, S.R.; ALVES, L.R.N.; LÔBO, R.N.B.; VILLELA, L.C.V. **Raça Morada Nova : Origem, Características e Perspectivas**. Primeira edição online. Embrapa Caprinos Sobral: Documentos Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008, 43p.

FALCHI, L.; TAEMA, M.; LA CLANCHE, S.; SCARAMUZZI, R.J. The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**, v.78, n.2, p.376–384, 2012.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2012. **Cryoconservation of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines (Vol. 12). Rome.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2013. **Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture**. In: The Second Report on the State of the World. [s.l: s.n.]. p. 16.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. **Animal Production and Health Guidelines**. In: In Vivo Conservation of Animal Genetic Resources. [s.l: s.n.]. v. 14.

FELTOVICH, H.; JI, H.; JANOWSKI, J.W.; DELANCE, N.C.; MORAN, C.C.; CHIEN, E.K. Effects of selective and nonselective PGE2 receptor agonists on cervical tensile strength and collagen organization and microstructure in the pregnant rat at term. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.192, n.3, p.753–760, 2005.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; BATISTA, R.I.T.P.; BRAIR, V.L.; LIMA, R.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v.00, n.June, p.1–4, 2019.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M.E.F.; LIMA, R.R.; SOUZA, G.N.; FONSECA, J.F. Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and nonsurgical embryo recovery. **Theriogenology**, v.145, p.238–246, 2020a.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; MAIA, A.L.R.S.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; BATISTA, R.I.T.P.; MORAIS, M.C.C.; LIMA, R.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F. Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. **Theriogenology**, v.155, p.132–138, 2020b.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; MAIA, A.L.R.S.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; BATISTA, R.I.T.P.; ARRAIS, A.M.; LIMA, R.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F. In vivo embryo production and recovery in Lacaune ewes after imposing a superovulation treatment regimen is related to pFSH dose. **Animal Reproduction Science**, v.223, p.106625, 2020c.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; MAIA, A.L.R.S.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; VERGANI, G.B.; OLIVEIRA, M.E.F.; LIMA, R.R.; FONSECA, J.F. Ultrasonographic cervical evaluation: a tool to select ewes for non-surgical embryo recovery. **Reproduction in Domestic Animals**, v.55, n.11, p.1638-1645, 2020d.

FONSECA, E.M.; WERNECK, F.P.; GEHARA, M.; OLIVEIRA, E.F.; MAGALHÃES, F.M.; LANNA, F.M.; LIMA, G.S.; MARQUES, R.; MESQUITA, D.O.; COSTA, G.C.;

COLLI, G.R.; GARDA, A.A. The role of strict nature reserves in protecting genetic diversity in a semiarid vegetation in Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, n. 11, p. 2877–2890, 2019a.

FONSECA, J.F. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006. 30 p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 64).

FONSECA, J.F.; BATISTA, R.I.T.P.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M.E.F.; BRANDÃO, F.Z.; VIANA, J.H.M. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, p.1489–1496, 2018.

FONSECA, J.F.; CRUZ, R.C.; PINTO, P.H.N.; FACÓ, O. **Manual de indução e sincronização do estro e ovulação em ovinos e caprinos**. Sobral, Ceará: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011. 59 p.

FONSECA, J.F.; ESTEVES, L.V.; ZAMBRINI, F.N.; BRANDÃO, F.Z.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M. Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.613-616, 2014.

FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; BRANDÃO, F.Z.; BATISTA, R.I.T.P.; GARCIA, A.R.; BARTLEWSKI, P.M.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. **Reproduction, Fertility and Development**, v.31, n.1, p.17-26, 2019b.

FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M.E.F.; LEITE, C.R.; NASCIMENTO-PENIDO, P.M.P.; BRANDÃO, F.Z.; LEHLOENYA, K.C. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.144–151, 2016.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.495–499, 2005.

FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; ALVIM, G.P.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; VIANA, J.H.N. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. **Small Ruminant Research**, v.111, n. 1-3, p.96–99, 2013.

FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; GUIMARÃES, J.D.; PEREIRA, V.S.A.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; RIBEIRO, C.; BRANDÃO, F.Z.; GARCIA, A.R.; ESTEVES, S.N.; MACHADO, R. Successful transcervical uterine flushing in Morada Nova sheep. In: **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2–29 May 2015, Belo Horizonte (Resumo).

FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, M.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; BRANDÃO, F.Z.; BARTLEWSKI, P.M.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.1, p.118–125, 2019c.

FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, M.R.; OLIVEIRA,

M.E.F.; BARTLEWSKI, P.M.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Cervical penetration rates and efficiency of nonsurgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. **Animal Reproduction Science**, v.203, p.25–32, 2019d.

FUERST, K.J.; BARTLEWSKI, P.M.; KING, W.A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Research**, v.82, n.2-3, p.144–148, 2009.

GANDINI, G.C.; OLLIVIER, L.; DANELL, B.; DISTL, O.; GEORGOUDIS, A.; GROENEVELD, E.; MARTINYUIK, E.; VAN ARENDONK, J.A.M.; WOOLLIAMS, J.A. Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds in Europe. **Livestock Production Science**, v.91, n.1–2, p.173–182, 2004.

GIBBONS, A.; BRUNO-GALARRAGA, M.; FERNANDEZ, J.; GONZALEZ-BULNES, A.; CUETO, M.I. Vitrified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. **Animal Reproduction**, v.16, n.2, p.297-301, 2019.

GONZALEZ-BULNES, A.; MENCHACA, A.; MARTIN, G.B.; MARTINEZ-ROS, P. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, n.5, p.441–452, 2020.

GOTTARDI, F.P.; SOUZA JUNIOR, A.; BARBOSA, Y.G.S.; MARQUES, C.A.T.; BEZERRA, L.R.; ARAÚJO, M.J.; MINGOTI, G.Z.; TORREÃO, J.N.C. Efeito do flushing sobre o desempenho reprodutivo de ovelhas Morada Nova e santa inês submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 329–338, 2014.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; BITTENCOURT, L.E.P.; MARTINS, H.D.G.; BARBOSA, L.P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.313–318, 2009.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; QUINTELA, A.; MOURA, J.C.A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; LIMA, M.C.C.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT, T.C.B.S.C.; BARBOSA, L.P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.1–10, 2007.

HARL, A.W. **Comparison of short-term vs. long-term estrous synchronization protocols using CIDR devices in sheep and goats during and outside the natural breeding season**. 2014. MSc thesis, Kansas State University, Manhattan, KS, 2014.

HASHEMI, M.; SAFDARIAN, M.; KAFI, M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. **Small Ruminant Research**, v.65, n.3, p.279–283, 2006.

KAABI, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; CHAMORRO, C.; BOIXO, J.; DEPAZ, P.; ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a post-mortem study. **Theriogenology**, v.66, p.1876–1883, 2006.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R.J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235, 2005.

KERSHAW-YOUNG, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; PITSILLIDES, A.A.; SCARAMUZZI, R.J. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.251–261, 2009.

LEITE, C.R.; FONSECA, J.F.; FERNANDES, D.A.M.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; ASCOLI, F.O.; BRANDÃO, F.Z. Cervical relaxation for non-surgical uterus access in Santa Inês ewes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1671–1679, 2018.

LEROY, G.; BOETTCHER, P.; BESBES, B.; DANCHIN-BURGE, C.; BAUNMUNG, R.; HIEMSTRA, S.J. Cryoconservation of animal genetic resources in Europe and two African countries: A gap analysis. **Diversity**, v.11, p.1–11, 2019.

LOBO, R.N.B.; PEREIRA, I.D.C.; FACÓ, O.; MCMANUS, M.C. Economic values for production traits of Morada Nova meat sheep in a pasture based production system in semi-arid Brazil. **Small Ruminant Research**, v.96, n.2-3, p.93–100, 2011.

LOPES-JÚNIOR, E.S.; MAIA, E.L.M.M.; PAULA, N.R.O.; TEIXEIRA, D.I.A.; VILLARROEL, A.B.S.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.555–561, 2006.

LUNA-PALOMERA, C.; MACÍAS-CRUZ, U.; SÁNCHEZ-DÁVILA, F. Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. **Tropical Animal Health and Production**, v.51, n.5, p.1283-1288, 2019.

LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J.M.; WILTBANK, M.C. The role of Luteinizing Hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.84, p.369–378, 2011.

MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.R.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of Brazilian biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p.62–66, 2016.

MAIA, A.L.R.S.; ARRAIS, A.M.; PRELLWITZ, L.; BATISTA, R.I.T.P.; FIGUEIRA, L.M.; CORREIA, L.F.L.; FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Embryo development is impaired in hydrometra-treated goats subjected to superovulation. **The Veterinary Record**, v.187, n.10, p.e88, 2020.

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, p.223–235, 2002.

MARTIN, G.B. Reproductive research on farm animals for Australia—Some long-distance goals. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, n.5, p.967–982, 1995.

- MARTIN, G.B.; KADOKAWA, H. “Clean, green and ethical” animal production. Case study: Reproductive efficiency in small ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, p.145–152, 2006.
- MARTINEZ, M.F.; MCLEOD, B.; TATTERSFIELD, G.; SMAILL, B.; QUIRKE, L.D.; JUENGEL, J.L. Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+progesterone oestrus synchronisation protocol. **Animal Reproduction Science**, v.155, p.28-35, 2015.
- MASOUDI, R.; SHAHNEH, A.Z.; TOWHIDI, A.; KOHRAM, H.; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; SHAHAB-EL-DEEN, M. Cervical dilation and improvement of reproductive performance in fat-tailed ewes via cervical dilator treatments. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.6, n.2, p.93–96, 2017.
- McKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; ROBERTSON, I.S. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. **Theriogenology**, v.25, n.6, p.855–865, 1986.
- McMANUS, C.; FACÓ, O.; SHIOTSUKI, L.; ROLO, J.L.J.P.; PERIPOLLI, V. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. **Small Ruminant Research**, v.170, p.37–42, 2019.
- McMANUS, C.; HERMUCHE, P.; PAIVA, S.R.; MORAES, J.C.F.; MELO, C.B.; MENDES, C. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v.3, p.1-15, 2013.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.4, p.403–413, 2004.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, v.72, p.477–483, 2009.
- MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.113–118, 2010.
- MONNIAUX, D.; BARIL, G.; LAINE, A.L.; JARRIER, P.; POULIN, N.; COGNIÉ, J.; FABRE, S. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**, v.142, n.6, p.845-54, 2011.
- MORAIS MCC, ESTEVES LV, SOUZA-FABJAN JMG, OLIVEIRA, M.E.F.; SILVA, M.R.; BRANDÃO, F.Z.; FONSECA, J.F. Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route. **Small Ruminant Research**, v.192, p.e106215, 2020.
- NASCIMENTO, P.M.P.; SANTOS, G.B.; PENIDO, A.O.; FONSECA, J.F.; LEITE, R.C. Identification of arthritis encephalitis caprine (CAEV) in flushing media and embryos from naturally infected herd goats. **Animal Reproduction**, v.12, p.703, 2015.

NRC (National Research Council). 2007. **Nutrient requirement of sheep**. Washington: National Academies of Science.

OLIVEIRA, F.C.; HAAS, C.S.; FERREIRA, C.E.R.; GOULARTE, K.L.; PEGORARO, L.M.C.; GASPERIN, B.G.; SCHNEIDER, A.; MONDADORI, R.G.; LUCIA JR.; T., VIEIRA, A.D. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. **Small Ruminant Research**, v.158, p.15–18, 2018a.

OLIVEIRA, M.E.F.; AYRES, H.; OLIVEIRA, L.G.; OBA, E.; KRIDLI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; FONSECA, J.F.; BICUDO, S.D.; 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**, v.174, p.80–86, 2016.

OLIVEIRA, M.E.F.; FELICIANO, M.A.; D'AMATO, C.C.; OLIVEIRA, L.G.; BICUDO, S.D.; FONSECA, J.F.; VICENTE, W.R.; VISCO, E.; BARTLEWSKI, P.M. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.144, n.1-2, p.30-7, 2014.

OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. 1^o edição. São Paulo: 2013.

OLIVEIRA, M.E.F., RIBEIRO, I.F., RODRIGUEZ, M.G.K., MACIEL, G.M., FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z.; BARTLEWSKI, P.M. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.3, p.742-750, 2018b.

OLIVEIRA, M.E.F.; ZAMBRINI, F.N.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; BARTLEWSKI, P.M.; GUIMARÃES, J.D.; BRANDÃO, F.Z.; FONSECA, J.F. Repeated transcervical embryo recoveries in Santa Inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. **Animal Reproduction Science**, v.217, e106469, 2020.

PIETROSKI, A.C.C.A.; BRANDÃO, F.Z.; SOUZA, J.M.G.; FONSECA, J.F. Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.168–173, 2013.

PINTO, P.H.N.; BALARO, M.F.A.; ARASHIRO, E.K.N.; BATISTA, R.I.T.P.; OLIVEIRA, M.E.F.; BRAGANÇA, G.M.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Produção in vivo de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.208-216, 2017.

PINTO, P.H.N.; BALARO, M.F.A.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; RIBEIRO, L.D.S.; BRAGANÇA, G.M.; LEITE, C.R.; ARASHIRO, E.K.N.; SILVA, K.M.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests. **Theriogenology**, v.113, p.146-152, 2018.

PINTO, P.H.N.; SANTOS, J.D.R.; BRANDÃO, F.Z.; BALARO, M.F.A. Colheita transcervical de embriões em ovelhas e cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, p.147-155, 2019.

- PRELLWITZ, L.; ZAMBRINI, F.N.; GUIMARÃES, J.D.; SOUSA, M.A.P.; OLIVEIRA, M.E.F.; GARCIA, A.R.; ESTEVES, S.N.; BARTLEWSKI, P.M.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; FONSECA, J.F. Comparison of the intravenous and intravaginal route of oxytocin administration for cervical dilation protocol and non-surgical embryo recovery in oestrous-induced Santa Inês ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.9, p.1230–1235, 2019.
- PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2017, 236p.
- QUEVEDO, D.A.C.; BOLAÑOS, C.A.D. Comparación de dos combinaciones de anestésicos inyectables utilizados en laparotomía medial para recuperación de embriones en ovejas criollas colombianas. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.1, n.33, p.83–92, 2016.
- RAMOS, A.F.; SILVA, B.D.M. Hormonal protocols in small ruminants. In: BERGSTEIN-GALAN, T.G. **Reproduction Biotechnology in Farm Animals**. AvidScience, p.138-154, 2018.
- REYNA, J.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Synchrony of ovulation and follicular dynamics in Merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.4, p.410–417, 2007.
- RIBEIRO, M.N.; ARANDAS, J.K.G.; PIMENTA FILHO, E.C.; SILVA, R.C.B.; FACÓ, O.; ESTEVES, S.N. Demografia e grau do perigo de extinção de ovinos da raça Morada Nova. **Zootecnia Tropical**, v.32, n.4, p.309–314, 2014.
- RIESENBERG, S.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in german merino ewes. **Theriogenology**, v.55, n.4, p.847–865, 2001.
- RODRIGUES, L.F.S.; ARAUJO, A.A.; NUNES, J.F.; MOURA, A.A.A.; MOREIRA, E. P. Sincronização do estro em ovelhas deslanadas: Efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina sobre a taxa de ovulação. **Revista Ciências Agrárias**, v.41, p.215–222, 2004.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3–4, p.271–287, 2003.
- RUTIGLIANO, H.M.; ADAMS, B.M.; JABLONKA-SHARIFF, A.; BOIME, I.; ADAMS, T.E. Effect of time and dose of recombinant follicle stimulating hormone agonist on the superovulatory response of sheep. **Theriogenology**, v.82, n.3, p.55-60. 2014.
- SANTOS, J.D.R.; UNGERFELD, R.; BALARO, M.F.A.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; COSENTINO, I.O.; BRAIR, V.L.; SOUZA, C.V.; PINTO, P.H.N.; BADE, A.L.C.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: The effectiveness and welfare implications of each technique. **Theriogenology**, v.153, p.112–121, 2020.
- SCHIEWE, M.C.; BUSH, M.; STUART, L.S.; WILDT, D.E. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. **Theriogenology**, v.22, p.675–82, 1984.
- SOUSA, R.T.; GONÇALVES, J.L.; FONTELES, N.L.O.; SANTOS, C.M.; RICCI, G.D.;

ALBUQUERQUE, F.H.M.A.T.; FERNANDES, F.E.P.; BOMFIM, M.A.D. Características reprodutivas de ovelha Morada Nova e Somalis Brasileira. **Pubvet**, v.9, n.11, p.495-501, 2015.

SOUZA-FABJAN, J.M.G.; BATISTA, R.I.T.P.; CORREIA, L.F.L.; PARAMIO, M.T.; FONSECA, J.F.; FREITAS, V.J.F.; MERMILLOD, P. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. **Reproduction, Fertility and Development**, v.33, p.31–54, 2021.

SOUZA-FABJAN, J.M.G.; ROSA, R.M.; BALARO, M.F.A.; PINTO, P.H.N.; SANTOS, G.B.; ARASHIRO, E.K.N.; FONSECA, J.F.; UNGERFELD, R. BRANDÃO, F.Z. Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. **Theriogenology**, v.103, p.24-29, 2017.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Fourth ed. Savoy, IL: IETS; 2010.

TEXEIRA, T.A.; FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; CARVALHEIRA, L.R.; FERNANDES, D.A.M.; BRANDÃO, F.Z. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v.48, n.3, p.545-51, 2016.

TORRÈS, S.; COGNIÉ, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. **Theriogenology**, v.27, n.2, p.407-419, 1987.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J.A.F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M.J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, p.76–87, 2006.

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

VIÑOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.80, n.1-2, p.69-79, 2004.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O.; HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. **In: Proceedings of the American Society of Animal Production**. p. 225–227, 1934.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; COSTINE, B.A.; LEWIS, G.S. Estradiol-17 β -oxytocin-induced cervical dilation in sheep: Application to transcervical embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v.77, n.10, p.2587–2593, 1999.

7 ANEXO

BIOPRESERVATION AND BIOBANKING
Volume 00, Number 00, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/bio.2020.0125

NonSurgical Embryo Recovery from Estrus-Synchronized or Superovulated Morada Nova Ewes: A Feasible Strategy for Sheep Embryo Banking

Aline Matos Arrais,¹ Marco Roberto Bourg de Mello,¹ Gabriel Brun Vergani,² Lucas Machado Figueira,³ Sérgio Novita Esteves,⁴ Verônica Schinaider do Amaral Pereira,⁴ Pawel Mieczyslaw Bartlewski,⁵ Maria Emilia Franco Oliveira,² Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan,³ and Jeferson Ferreira da Fonseca⁶

This study assessed the feasibility of *in vivo* embryo production and nonsurgical embryo recovery (NSER) in Morada Nova ewes (an endangered native Brazilian breed of sheep) subjected to different estrus synchronization and/or superovulation protocols. Ewes received intravaginal sponges soaked with 60 mg medroxyprogesterone acetate (MAP), which were kept in place for six (G6; $n=12$), nine (G9; $n=12$), or 12 (G12; $n=12$) days. Half of the ewes in each group remained estrus synchronized only (SYNCH) and the other half was superovulated (SOV) with 133 mg porcine follicle-stimulating hormone (pFSH). There were no differences ($p>0.05$) in antral follicle counts determined with ultrasonography 60 hours before MAP sponge removal (or at the time of the first pFSH dose) among G6 (6.4 ± 0.9), G9 (6.2 ± 0.7), and G12 (5.5 ± 0.6). Estrus responses and NSER success rates did not vary ($p>0.05$) among the three progestin-treatment groups of ewes for either estrus-induced or superovulated animals. The onset of estrus occurred 10–12 hours later ($p<0.01$) in G9_{SYNCH} ewes compared with G6_{SYNCH} and G12_{SYNCH}, and the duration of estrus was ~ 19 hours greater ($p<0.01$) in G9_{SOV} than in G6_{SOV}. The average duration of the NSER procedure was 32.6 ± 1.3 minutes. At least one structure was recovered in 85.7% of synchronized and in 87.5% of superovulated ewes. Viable embryo recovery rates were also similar ($p>0.05$) for G6 (1.0 ± 0.3 and 2.5 ± 1.5), G9 (1.3 ± 0.5 and 4.8 ± 2.0), and G12 groups (1.0 ± 0.3 and 4.8 ± 2.3 ; estrus-synchronized and superovulated ewes, respectively). In conclusion, progestogen pretreatment of different durations and NSER can be employed in Morada Nova ewes, resulting in reasonable viable embryo recovery rates in both estrus-synchronized and superovulated animals. Therefore, both techniques are suitable for use in commercial settings as well as small ruminant conservation programs.

Keywords: *in vivo* embryo production, naturalized breed, NSER, ovine, superovulation

Introduction

BRAZIL, JUST AS many other colonized countries, has a vast variety of naturalized animals, which have adapted to its peculiar and diverse biome conditions. Due to their impact on local economy and sustainable agriculture practices, several naturalized animal breeds were included in the Conservation and Utilization of Genetic Resources program founded by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) in 1983.¹ The Morada Nova is one of the main

naturalized sheep breeds in Brazil and its genotype is probably of African origin, with some contribution from the Portuguese Bordaleiro breed.² Morada Nova sheep are haired animals of a relatively small size (sexually mature ewes reach body weight of 30–50 kg), characterized by moderate prolificacy (1.5) and good ability to produce meat and hides even under unfavorable climatic conditions.³ Despite their importance for sustainable production systems,² indiscriminate crossbreeding due to general preference of sheep breeders for more specialized breeds brought

¹Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brazil.

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil.

⁴Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, Brazil.

⁵Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Canada.

⁶Embrapa Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, Brazil.

Morada Nova sheep to the brink of extinction.^{2,4,5} In 2009, the Morada Nova was added to the Embrapa's genetic resources conservation program, whose objectives entail the creation of germplasm banks for endangered livestock breeds and species.

Reproductive biotechnologies are pivotal tools for saving and maintaining endangered species.⁶ Assisted reproductive techniques, such as *in vivo* embryo production (IVP), are essential to overcome the risk of animal extinction. These techniques accelerate the propagation of herds, increase genetic gain from both males and females, and the resultant embryos may be cryopreserved to create germplasm banks. The female donors used for IVP are typically subjected to superovulatory treatments conducted in conjunction with an estrus synchronization protocol using exogenous progestins (e.g., medroxyprogesterone acetate—MAP). There is tremendous variability in ovarian responses to estrus and ovulation synchronization protocols in sheep.⁷ In the past, our research team aimed to establish the optimal duration of the treatment with progestogen-releasing devices for estrus synchronization and superovulation in Lacaune^{8,9} and Santa Inês ewes.¹⁰ To date, however, there have only been three documented attempts to perform hormonal superovulation in Morada Nova ewes of either white¹¹ or red^{12,13} variety, and all those attempts used the long-term (14 days) progestogen priming. Even though progestogen priming is essential to synchronize estrus and ovulations and to reduce the incidence of inadequate corpora lutea (CL) after mating, long-term exposure (10–18 days) to intravaginal progestogen-releasing devices may be associated with declining fertility in ewes.¹⁴ Shortening the period of treatment with progestogen inserts is also desirable because it reduces the loss of intravaginal devices as well as the occurrence of vaginal discharges and infections.¹⁵ In anestrus Saanen goats, the estrus synchronization treatments using progestogen-impregnated sponges inserted for 6, 9, or 12 days yielded similar results,¹⁶ but such a comparative study does not exist for Morada Nova ewes.

Although embryo collection in sheep is still done mainly by laparotomy, there is a great deal of evidence to suggest that nonsurgical embryo recovery (NSER) is equally efficient.¹⁷ When both approaches were compared, NSER has proven to be equally or more effective in terms of embryo recovery rates but significantly less stressful to animals than laparotomy.^{18,19} Moreover, significant advances in the application of NSER have recently been achieved in both nonsuperovulated (estrus-synchronized) and superovulated Santa Inês,^{10,20} Lacaune,^{8,9} and Dorper ewes.²¹ In Morada Nova ewes, however, two previous studies employed laparotomy^{11,13} and the only attempt to use NSER for embryo flushing was unsuccessful.¹² Considering the present concerns about animal wellbeing,^{22–24} the development of efficient NSER in different strains of sheep is of paramount importance.

As with other endangered breeds or animal species, both the superovulatory regimens and embryo collection techniques ought to be considered to effectively implement embryo germplasm banking. Moreover, embryo recovery from nonsuperovulated animals can also contribute to the enrichment of germplasm banks.^{25,26} Cryopreservation is one of the best strategies for animal biobanking. Although embryo freezing and storage are more expensive than gamete preservation, the use of embryos is associated with

accelerated breed reconstitution compared with that attained using only semen.²⁷ Lastly, the use of less-invasive approaches is highly preferable in conservation programs of endangered animals. Thus, the main goal of the present study was to compare the ovarian responses and IVP embryo yields in nonsuperovulated and superovulated Morada Nova ewes subjected to either short- (6 days), intermediate- (9 days), or long-term (12 days) progestin-based estrus synchronization protocols and NSER.

Materials and Methods

General experimental conditions

The Animal Care Ethics Committee of Embrapa Dairy Cattle (process: 2512100516) had approved this study. The present experiment was carried out during the breeding season (July to August) in São Carlos, Brazil (latitude 22°01'S, longitude 47°54'W, altitude 850 m above sea level). Thirty-six clinically healthy, multiparous ewes and four rams of Morada Nova breed (red variety) were used in this study; no animal showed any signs of reproductive abnormalities detectable with sonographic and gynecological/andrological examinations. The animals were kept in paddocks of *Panicum maximum* cv. *Aruana* grass and received daily rations of concentrate, according to their nutritional demand. Mineral salt licks and water were available *ad libitum*.

Experimental design

Estrus synchronization and superovulation protocols are depicted in Figure 1, from 4 consecutive days ($n=9$ ewes per day) with the same number of ewes of each progestogen duration and a similar number of estrus-induced and superovulated ewe for progestogen duration daily. The Morada Nova ewes were allotted by age, weight, and body condition score (BCS; 1=thin to 5=obese) to three groups (each $n=12$) (Fig. 1). All ewes were fitted with intravaginal sponges containing 60 mg of MAP (Progespon[®]; Syntex, Buenos Aires, Argentina) that were kept in place for six (G6; age: 49.0 ± 4.3 months, weight: 40.5 ± 1.2 kg, and BCS of 3.3 ± 0.1), nine (G9; age: 51.0 ± 5.1 months, weight: 41.2 ± 1.7 kg, and BCS of 3.3 ± 0.1), or 12 days (G12; age: 51.0 ± 4.2 months, weight: 41.6 ± 1.6 kg, and BCS of 3.3 ± 0.1). The sponges were inserted and removed between 5 and 6 pm. The estrus-synchronized ewes (G6_{SYNCH}, G9_{SYNCH}, and G12_{SYNCH}) received 200 IU of equine chorionic gonadotropin for follicular growth induction and ovulation (Folligon 5000[®], MSD Animal Health, Cruzeiro, SP, Brazil) intramuscular (i.m.) and 37.5 μ g of an analog of PGF2- α for luteolysis (D-cloprostenol; Prolise[®]; ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) i.m. 12 hours before MAP sponge removal. The remaining animals (G6_{SOV}, G9_{SOV}, and G12_{SOV}) underwent superovulatory treatment with 133 mg of porcine follicle-stimulating hormone (pFSH; Folltropin[®]; Vetoquinol, Mairiporã, Brazil), given at 12-hour intervals in six decreasing doses (25-25-15-15-10-10% of the total amount of pFSH), starting 60 hours before MAP sponge removal. All ewes also received 50 μ g of gonadotropin hormone-releasing hormone (GnRH) analog—gonadorelin acetate, for induction of ovulation (Gestran[®]; Tecnopec, São Paulo, Brazil) 36 hours after MAP sponge removal. Estrus was detected twice daily, and the ewes were hand

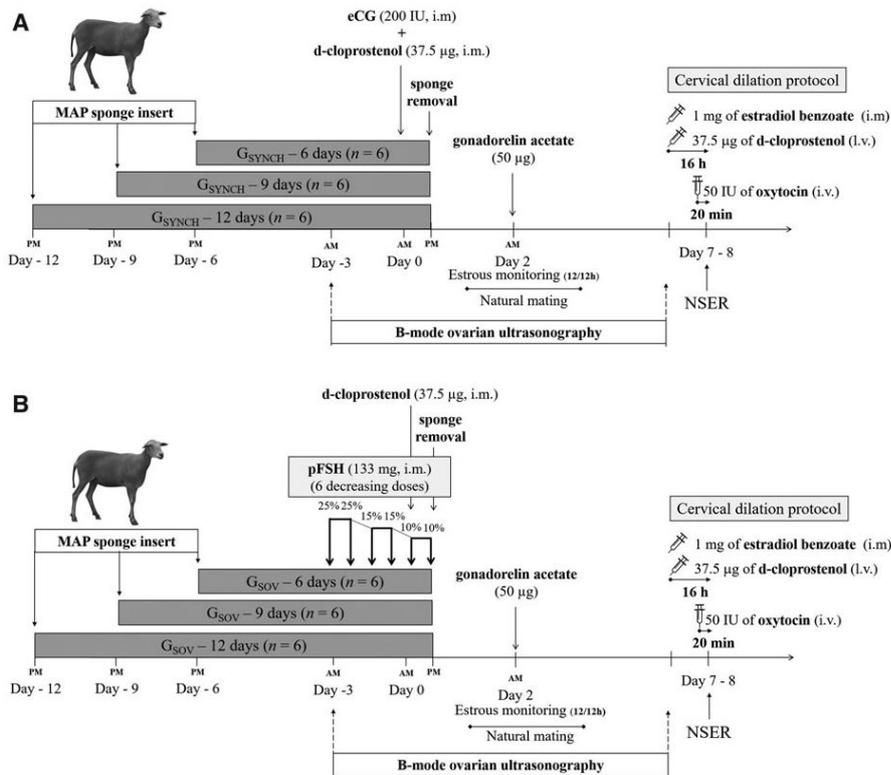


FIG. 1. Schematic representation of the experimental procedures designed to evaluate different progestogen-based estrus synchronization protocols (short- [6 days], intermediate- [9 days], or long term [12 days]) in (A) estrus-synchronized only (SYNCH) and (B) estrus-synchronized and superovulated (SOV) Morada Nova ewes. eCG, equine chorionic gonadotropin; i.m., intramuscular; i.v., intravenous; l.v., laterovulvar; MAP, medroxyprogesterone acetate.

mated by fertile rams. All ewes were bred at onset of estrus and 24 hours later if they were still in heat (up to two matings). At each estrus detection, the ewes that had not been mated (e.g., starting estrus) were prioritized while group of ewes starting estrus at the same time had the second bred in inverted sequence of first mating. Rams mounted one to four ewes daily for 4 days.

Ovarian ultrasonographic evaluation

Ovaries were scanned with a portable B-mode scanner (M5 Vet[®]; Mindray, Shenzhen, China) equipped with a 7.5-MHz transrectal transducer adapted for use in small ruminants. Ultrasonographic examinations were performed in all ewes 60 hours before MAP sponge removal (at the time of the first pFSH dose in superovulated ewes) and 16 hours before NSER to determine the number of visible antral follicles and CL, respectively. Ovarian follicles were grouped according to their diameters into: Class 1 (≤2 mm), Class 2 (2.1–3.0 mm), Class 3 (3.1–4.0 mm), Class 4 (4.1–5.0 mm), and Class 5 (>5.0 mm).²⁸

NSER procedures

All mated ewes were prepared for the cervical dilation protocol using both physical and chemical restraint as previously described.²⁹ NSER was performed 6–7 days after the onset of estrus. Cervical assessment, anesthetic desensitization, clipping, and retraction were performed as previously described for Lacaune ewes.⁸ After retraction, Hegar dilators (size 3–4) were used to traverse the uterine cervix. The “cervical map” depicting the location of all cervical rings was recorded¹⁷ and the time taken to traverse the uterine cervix was recorded. The Hegar dilator was kept in place for 30 seconds and then removed, and a sterile catheter #8 equipped with a metal mandrel was inserted and used to traverse the cervical rings. Each uterine horn was flushed separately with successive injections and aspirations of a total of 180 mL/horn of sterile phosphate-buffered saline prewarmed to 37°C (plus 40 mL to wash the flushing apparatus). All recovered structures, including unfertilized eggs were enumerated for the fertilization condition (fertilized and nonfertilized), and the embryos were classified

Downloaded by UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO from www.liebertpub.com at 03/29/21. For personal use only.

based on their developmental stage (morulae to expanded blastocyst) and quality (1=excellent or good, 2=fair, 3=poor, and 4=dead or degenerated) as detailed by the International Embryo Technology Society manual.³⁰ Embryos of quality 1–3 were cryopreserved by slow freezing according to a method described by Figueira et al.,³¹ and were added to the Brazilian embryo biobank for future use.

Study end points and statistical analysis

The following data were recorded at 60 hours before MAP sponge removal (time of the first pFSH injection in superovulated ewes): percentage of ewes with large antral follicles (≥ 5 mm in diameter); diameter of the largest follicle (mm); total follicle count and number of follicles in different size classes per ewe (class 1: 1.0–2.0 mm; class 2: 2.1–3.0 mm; class 3: 3.1–4.0 mm; class 4: 4.1–5.0 mm; and class 5: >5.0 mm). Subsequently, the following data were recorded or calculated: estrus response (number of ewes in estrus/number of treated ewes $\times 100\%$); timing of the onset of estrus (in hours, time from MAP sponge removal to estrus detection); duration of estrus (in hours); number of CL per ewe; percentage of ewes successfully penetrated and flushed (ewes flushed/total number of ewes $\times 100\%$); number of CL per flushed ewe; duration of the cervical penetration procedure by Hegar and mandrel/catheter (in minutes, time from Hegar dilator or mandrel/catheter insertion to its removal); duration of the uterine flushing procedure (in minutes, time from flushing catheter insertion to its removal); duration of NSER procedure (in minutes, time from epidural anesthesia to catheter removal/cervical unclipping); fluid recovery efficiency (volume of fluid retrieved/total fluid infused $\times 100\%$); recovery rate (total number of non-fertilized eggs and embryos recovered/number of CL detected with ultrasonography $\times 100\%$); embryo viability rate (number of embryos with quality scores of 1–3/total structures recovered $\times 100\%$); successful recovery rate (number of ewes with at least one structure recovered/number ewes flushed $\times 100\%$); total number of structures (i.e., embryos and/or nonfertilized eggs) recovered per ewe; number of viable embryos (embryo quality of 1 to 3); and number of degenerated embryos per donor ewe.

Data analysis was performed using the R software (version 3.6.1; the R Foundation for Statistical Computing). The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of the residues and homogeneity of variance was assessed by Levene's test. Whenever necessary, the Box–Cox transformation of the original data was performed. Non-parametric analyses were done using the Kruskal–Wallis test, Chi-square, and Fisher's exact test. Parametric data were analyzed by analysis of variance followed by Tukey's test for comparisons of individual mean values. Results are presented as mean \pm standard error of the mean unless otherwise indicated. The level of significance used for all analyses was 5%.

Results

Ovarian follicular profiles recorded at 60 hours before MAP sponge removal in all ewes studied are given in Table 1. No difference was observed ($p > 0.05$) for any of the parameters related to antral follicle population among the three groups of ewes (exposed to progestin pretreatments of varying duration).

TABLE 1. END POINTS (% OR MEAN \pm STANDARD ERROR OF THE MEAN) RELATED TO OVARIAN ANTRAL FOLLICLE POPULATIONS DETERMINED ULTRASONOGRAPHICALLY AT 60 HOURS BEFORE MEDROXYPROGESTERONE ACETATE-SPONGE REMOVAL IN MORADA NOVA EWES THAT UNDERWENT EITHER SHORT- (6 DAYS, G6), INTERMEDIATE- (9 DAYS, G9) OR LONG-TERM (12 DAYS, G12) PROGESTIN PRETREATMENT

End points	G6	G9	G12
Ewes with ≥ 5 mm follicles (%)	50.0 (6/12)	41.7 (5/12)	25.0 (3/12)
Diameter of the largest follicle (mm)	4.8 \pm 0.4	4.7 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3
Total follicles count	6.4 \pm 0.9	6.2 \pm 0.7	5.5 \pm 0.6
No. of follicles			
Class 1 (1.0–2.0 mm)	2.3 \pm 0.6	3.1 \pm 0.7	1.3 \pm 0.3
Class 2 (2.1–3.0 mm)	1.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.3	1.9 \pm 0.5
Class 3 (3.1–4.0 mm)	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3
Class 4 (4.1–5.0 mm)	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1
Class 5 (>5.0 mm)	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1

Various end points obtained after MAP sponge withdrawal in estrus-synchronized and superovulated Morada Nova are presented in Tables 2 and 3, respectively. In estrus-synchronized ewes, the mean interval from MAP sponge removal to the onset of estrus was approximately 10–12 hours longer ($p < 0.01$) for G9_{SYNCH} ewes compared with the animals subjected to either G6_{SYNCH} or G12_{SYNCH} protocol (Table 2). The duration of estrus was greater ($p < 0.01$) after the G9_{SOV} protocol compared with the G6_{SOV} protocol (Table 3). All ewes, with the uterine cervix successfully transversed with the Hegar dilator, could also be penetrated with the mandrel/catheter and undergo uterine flushing. All ewes in which cervical penetration with the Hegar dilator was not possible, cervical clipping and traction could be performed and the uterine cervix appeared relaxed, but a large misalignment of the cervical ring was evident.

There were no significant differences ($p > 0.05$) for any of the variables related to estrus responses or the efficiency of the NSER procedure among the three subsets of ewes varying in the duration of progestogen exposure, in either estrus-synchronized (Table 2) or superovulated animals (Table 3). The end points were therefore pooled for all superovulated (SOV) and synchronized (SYNCH) animals, regardless of the duration of MAP treatment, and presented in Table 4.

Discussion

This is the first report of IVP followed by NSER in a naturalized Brazilian breed of sheep (Morada Nova) at the risk of extinction.^{3–5} Therefore, this study helped us gather useful information on the outcomes of estrus synchronization and hormonal ovarian stimulation protocols as well as the feasibility of NSER in Morada Nova ewes. From all indications, NSER is a valuable method not only for commercial applications but also for the purpose of small ruminant conservation.

The onset of estrus was delayed in G9_{SYNCH} ewes compared with the two other groups of estrus-induced Morada Nova ewes. Hari³² reported that the short-term progestogen-based estrus synchronization regimens were associated with a delayed onset of estrus in ewes during the breeding season, indicating the occurrence of a delayed and/or longer period

TABLE 2. ESTRUS CHARACTERISTICS AND NSER RESULTS (% OR MEAN \pm STANDARD ERROR OF THE MEAN) RECORDED IN MORADA NOVA EWES SUBJECTED TO MEDROXYPROGESTERONE ACETATE-BASED ESTRUS SYNCHRONIZATION PROTOCOLS OF VARYING DURATIONS AND NONSURGICAL EMBRYO RECOVERY 6–7 DAYS AFTER THE ONSET OF ESTRUS

End points	G6 _{SYNCH}	G9 _{SYNCH}	G12 _{SYNCH}
Estrus response (%)	100.0 (6/6)	83.3 (5/6)	100.0 (6/6)
Estrus onset (hours)	38.0 \pm 3.7 ^b	48.0 \pm 0.0 ^a	36.0 \pm 0.0 ^b
Estrus duration (hours)	24.0 \pm 0.0	19.2 \pm 2.9	26.0 \pm 2.0
No. of corpora lutea per ewe	1.8 \pm 0.3 [11]	2.8 \pm 0.4 [14]	2.0 \pm 0.3 [12]
Ewes successfully penetrated and flushed (%)	83.3 (5/6)	80.0 (4/5)	83.3 (5/6)
No. of corpora lutea per flushed ewe	1.8 \pm 0.4 [9]	2.8 \pm 0.5 [11]	1.8 \pm 0.2 [9]
Duration of the cervical penetration by Hegar (minutes)	5.8 \pm 2.2	2.8 \pm 0.9	2.0 \pm 0.3
Duration of the cervical penetration by mandrel/catheter (minutes)	2.2 \pm 0.5	2.3 \pm 0.3	4.2 \pm 1.5
Duration of uterine flushing procedure (minutes)	21.1 \pm 4.8	19.8 \pm 7.0	23.1 \pm 5.8
Duration of NSER procedure (minutes)	33.6 \pm 1.7	34.8 \pm 1.8	32.4 \pm 3.2
Fluid recovery efficiency (%)	99.5 \pm 0.5 (97 to 100)	100.0 \pm 0.0 (100)	100.0 \pm 0.0 (100)
Recovery rate (%)	77.7 [7/9]	45.4 [5/11]	55.5 [5/9]
Embryo viability rate (%)	71.4 [5/7]	100.0 [5/5]	100.0 [5/5]
Ewes with structures recovered (%)	100.0 (5/5)	75.0 (3/4)	80.0 (4/5)
Ewes with viable embryos recovered (%)	80.0 (4/5)	75.0 (3/4)	80.0 (4/5)
Total structures recovered per ewe	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3
Viable embryos per ewe	1.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3
Degenerated embryos per ewe	0.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Unfertilized eggs per ewe	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Synchronization protocols consisted of 60 mg MAP intravaginal sponge for 6 (G6_{SYNCH}), 9 (G9_{SYNCH}), or 12 (G12_{SYNCH}) days plus 200 IU of eCG and 37.5 μ g of D-cloprostenol 12 hours before sponge removal; additionally, 50 μ g of gonadorelin acetate was applied 36 hours after MAP treatment. (), Number of animals or range; [], total number of corpora lutea or structures or their proportions.

^{a,b}Within a row, mean with different letter superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

eCG, equine chorionic gonadotropin; MAP, medroxyprogesterone acetate; NSER, nonsurgical embryo recovery.

TABLE 3. ESTRUS CHARACTERISTICS AND NSER RESULTS (% OR MEAN \pm STANDARD ERROR OF THE MEAN) RECORDED IN MORADA NOVA EWES SUBJECTED TO MEDROXYPROGESTERONE ACETATE-BASED ESTRUS SYNCHRONIZATION PROTOCOLS OF VARYING DURATIONS, HORMONAL SUPEROVULATION, AND NONSURGICAL EMBRYO RECOVERY 6–7 DAYS AFTER THE ONSET OF ESTRUS

End points	G6 _{SOV}	G9 _{SOV}	G12 _{SOV}
Estrus response (%)	100.0 (6/6)	83.3 (5/6)	100.0 (6/6)
Estrus onset (hours)	22.0 \pm 2.0	16.8 \pm 2.9	26.0 \pm 3.7
Estrus duration (hours)	34.0 \pm 3.7 ^b	52.8 \pm 4.8 ^a	40.0 \pm 4.0 ^{ab}
No. of corpora lutea per ewe	7.8 \pm 2.8 [47]	12.0 \pm 1.5 [60]	11.5 \pm 1.9 [69]
Ewes successfully penetrated and flushed (%)	100.0 (6/6)	100.0 (5/5)	83.3 (5/6)
No. of corpora lutea per flushed ewe	7.8 \pm 2.8 [47]	12.0 \pm 1.5 [60]	10.4 \pm 1.8 [52]
Duration of the cervical penetration by Hegar (minutes)	4.7 \pm 1.1	2.2 \pm 0.4	1.8 \pm 0.4
Duration of the cervical penetration by mandrel/catheter (minutes)	2.0 \pm 0.4	1.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.4
Duration of uterine flushing procedure (minutes)	30.2 \pm 4.6	20.1 \pm 5.0	20.1 \pm 4.6
Duration of NSER procedure (minutes)	37.3 \pm 4.9	29.0 \pm 2.9	28.2 \pm 1.8
Fluid recovery efficiency (%)	99.0 \pm 1.0 (94 to 100)	98.5 \pm 1.5 (92 to 100)	100.0 \pm 0.0 (100)
Recovery rate (%)	44.6 [21/47]	66.6 [40/60]	65.3 [34/52]
Embryo viability rate (%)	71.4 [15/21]	60.0 [24/40]	70.5 [24/34]
Ewes with structures recovered (%)	66.6 (4/6)	100.0 (5/5)	100.0 (5/5)
Ewes with viable embryos recovered (%)	66.6 (4/6)	80.0 (4/5)	100.0 (5/5)
Total structures recovered per ewe	3.5 \pm 1.5	8.0 \pm 2.7	6.8 \pm 2.9
Viable embryos per ewe	2.5 \pm 1.5	4.8 \pm 2.0	4.8 \pm 2.3
Degenerated embryos per ewe	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.7
Unfertilized eggs per ewe	1.0 \pm 0.7	2.8 \pm 1.6	1.2 \pm 0.7

Superovulatory protocol consisted of 60 mg MAP intravaginal sponge for 6 (G6_{SOV}), 9 (G9_{SOV}), or 12 (G12_{SOV}) days with 133 mg of pFSH administered in six decreasing doses (25-25-15-15-10-10%) at 12-hour intervals starting 60 hours before MAP-sponge removal; both 200 IU of eCG and 37.5 μ g of cloprostenol were administered 12 hours before the end of MAP treatment; additionally, 50 μ g of gonadorelin acetate was applied 36 hours after MAP-sponge removal. (), number of animals or range; [] total number of corpora lutea or structures or their proportions.

^{a,b}Within a row, mean with different letter superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

pFSH, porcine follicle-stimulating hormone.

TABLE 4. END POINTS (% OR MEAN \pm STANDARD ERROR OF THE MEAN) RECORDED IN MORADA NOVA EWES SUBJECTED TO ESTROUS SYNCHRONIZATION PROTOCOL WITH INTRAVAGINAL DEVICES CONTAINING 60 MG OF MEDROXYPROGESTERONE ACETATE FOR 6 (SHORT-), 9 (INTERMEDIATE-), OR 12 (LONG-TERM) DAYS PLUS 200 IU OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN AND 37.5 μ G OF CLOPROSTENOL GIVEN 12 HOURS BEFORE AND 50 μ G OF GONADORELIN ACETATE GIVEN 36 HOURS AFTER DEVICE REMOVAL, FOLLOWED (SOV) OR NOT (SYNCH) BY THE SUPEROVULATORY TREATMENT WITH 133 MG OF PORCINE FOLLICLE-STIMULATING HORMONE, AND NONSURGICAL EMBRYO RECOVERY (NSER) 6–7 DAYS AFTER THE ONSET OF ESTRUS

End points	SYNCH	SOV	p
Estrous response (%)	94.4 (17/18)	94.4 (17/18)	n.s.
Onset of estrus (hours)	40. \pm 1.8	21.9 \pm 1.9	<0.001
Duration of estrus (hours)	23.3 \pm 1.2	41.6 \pm 2.9	<0.001
No. of corpora lutea per ewe	2.2 \pm 0.3 [37]	10.4 \pm 1.3 [176]	<0.01
Ewes successfully penetrated and flushed (%)	82.3 (14/17)	94.1 (16/17)	n.s.
No. of corpora lutea per flushed ewe	2.1 \pm 0.2 [29]	9.9 \pm 1.2 [159]	<0.01
Duration of cervical penetration with the Hegar dilator (minutes)	3.6 \pm 0.9	3.0 \pm 0.5	n.s.
Duration of cervical penetration with the mandrel/catheter (minutes)	3.0 \pm 0.6	1.8 \pm 0.2	<0.05
Duration of NSER procedure (minutes)	33.5 \pm 1.3	31.9 \pm 2.3	n.s.
Fluid recovery efficiency (%)	99.8 \pm 0.2	99.2 \pm 0.6	n.s.
Structures recovery (%)	58.6 [17/29]	59.7 [95/159]	n.s.
Ewes with successful structures recovery (%)	85.7 (12/14)	87.5 (14/16)	n.s.
Total structures recovered per ewe flushed	1.2 \pm 0.2	5.9 \pm 1.4	<0.01
Unfertilized eggs	0.0 \pm 0.0	1.6 \pm 0.6	<0.05
Nonviable embryos	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	n.s.
Viable embryos	1.1 \pm 0.2	3.9 \pm 1.1	<0.05
Embryo viability (%)	88.2 [15/17]	66.3 [63/95]	n.s.

(), number of animals; [] total number of corpora luteal/structures or their proportions. The pFSH was administered in six decreasing doses (25-25-15-15-10-10%) at 12-hour intervals, starting 60 hours before device removal, and NSER was performed 6–7 days after the onset of behavioral estrus.
n.s., not significant.

of antral follicular maturation. Since ultrasonographic examinations did not reveal any differences in antral follicle populations among the three groups at 60 hours before sponge removal, this difference is most likely due to subtle dissimilarities in follicular estrogenicity.³³ It is feasible that dominant antral follicles in G6_{SYNCH} ewes were recruited from the first ovarian follicular wave emerging after sponge insertion.³⁴ These follicles could still be in their growing phase around the time of MAP sponge withdrawal, which resulted in the earlier attainment of estradiol threshold heralding behavioral estrus as compared with G9_{SYNCH}.³⁵ Moreover, the duration of behavioral estrus was longer in G9_{SOV} compared with G6_{SOV} superovulated ewes. This fact could also be attributed to the stage of dominant follicle lifespan at which MAP sponges were removed and numerically ($p > 0.05$) greater numbers of potentially estrogenic, ovulatory follicles in G9_{SOV} (12.0 CL) than in G6_{SOV} (7.8 CL). Nevertheless, our present observations indicate that short-, intermediate-, and long-term estrus induction protocols can all be used in cyclic Morada Nova ewes.

The average flushing efficiency as well as viable embryo production and recovery rates for nonsuperstimulated Morada Nova ewes were comparable to those recently reported in synchronized Santa Inês^{20,29,36} and Lacaune ewes.⁸ Considering the low level of NSER invasiveness (e.g., compared with laparotomy¹⁹), the use of this method permits frequent embryo recoveries in Morada Nova ewes following estrus synchronization. NSER can be successfully performed in non-superovulated Morada Nova ewes yielding, on the average, one viable embryo per ewe without the need for food and water deprivation, in animals restrained in a standing position, and in the presence of other animals. Clearly, nonsuperovulated ewes can be an additional source of valuable genetic material, with

the ewes subjected to estrus synchronization and NSER being returned to the breeding flock, without any adverse effects on their fertility and overall health status.²¹

The mean number of viable embryos per donor ewe in the G9_{SOV} and G12_{SOV} groups of the present study (~5 viable embryos per flushed ewe) was similar to that recovered by laparotomy from superovulated Morada Nova ewes (4.9–5.6 viable embryos per flushed ewe^{11,13}). This is highly encouraging and warrants further trials and ultimate implementation of hormonal superovulation combined with NSER in Morada Nova ewes and other endangered small ruminant species.

All Morada Nova ewes, in which the cervix could be penetrated with the Hegar dilator, could also be penetrated with a mandrel/flushing catheter. Both penetration tests have been performed after estrus synchronization to select animals that are suitable for NSER after hormonal superstimulation.³⁶ It is worth noting that the present Morada Nova ewes are the second breed of sheep for which NSER was successful in 100% of animals, as reported for superovulated Lacaune sheep.³⁷ In earlier studies, the percentage of estrus-synchronized ewes successfully penetrated with the mandrel/catheter was lower compared with that penetrated with the Hegar dilator (by 5% in Lacaune ewes,³⁷ by 3% in Dorper ewes,²¹ and by 40% in Santa Inês ewes²⁰). The main reasons for impeded or incomplete cervical penetration in ewes are the lack of sufficient cervical dilation and/or anatomical problems that hinder visualization, clipping, or retraction of the os cervix by an operator. A high degree of cervical ring misalignment can typically be observed in the ewes that cannot be penetrated with the Hegar dilator. In the past, some sheep successfully penetrated with the Hegar dilator could not be penetrated with the mandrel/catheter probably because the latter is less rigid than the Hegar dilator.^{20,21}

As expected, the superovulatory treatment in this study resulted in nearly five times more ovulations and yielded approximately four times more viable embryos compared with the estrus synchronization regimen. However, since cervical penetration and uterine flushing were feasible in both subsets of animals, it is evident that embryo recovery can successfully be performed in estrus-induced and superovulated ewes using NSER. Embryo collection from nonsuperovulated animals can be preferred in some instances (e.g., due to limited cost or availability of animal facilities for housing the donor ewes throughout the period of hormone administration). NSER is less invasive an approach compared with laparotomy and hence is a better option in terms of maintaining animal wellbeing.^{18,19} Simple anesthesia/analgesia protocols and short period of recuperation post-treatment make NSER a valid alternative to surgical procedures for embryo recovery in small ruminants, especially during the conservation programs with limited numbers of available animals. The entire NSER procedure does not require animal fasting, can be performed in under 30 minutes by experienced/trained individuals, and after the procedure all ewes can return immediately to their routine management conditions. The most recently updated report on Animal Production and Health/Cryopreservation and Genetics Recourses (FAO)³⁸ does not recommend NSER for sheep and goats. This was based largely on the results of earlier studies indicating that NSER was less effective in terms of embryo recovery rates and that embryos collected by NSER resulted in lower pregnancy rates per transferred embryo than those achieved with surgical transfer. However, more recent studies in Santa Inês,^{10,19,20,29,36} Dorper,²¹ and Lacaune ewes,^{8,9} as well as in dairy goats^{39,40} have shown that: (1) in a vast majority of estrus-synchronized or superovulated ewes and goats, NSER resulted in the retrieval of at least one viable embryo; (2) embryo flushing efficiency was similar to that achieved with laparotomy; and (3) NSER was more suitable a technique with regard to animal wellbeing concerns.¹⁹ The current study using Morada Nova ewes fully confirmed those earlier observations, reporting 85.7% or 87.5% of ewes with at least one embryo recovered and an average of 1.1 or 3.9 viable embryos recovered per donor ewe for estrus-induced and superovulated animals, respectively. Finally, the FAO report³⁸ also emphasized the risks of disease transmission associated with embryo transfer. However, the potential risk of Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) transmission was reduced with the use of NSER and NSET compared with laparotomy, probably due to the 10-fold greater virus dilution factor (400 mL flushing media used for NSER vs. 40 mL of holding media used for laparoscopic deposition^{41,42}). Collectively, NSER has the makings of the technique to provide more suitable solutions for other genotypes of endangered sheep and goats as well as for wild-living animals.

Embryo quality is of primary concern during the application of assisted reproductive techniques. Our group has recently reported satisfactory pregnancy rates following the transfer of either fresh^{43,44} or cryopreserved (slow freezing;^{43,45}) small ruminant embryos collected by NSER. The success of slow freezing has also been confirmed by molecular approach for sheep embryos.⁴⁶ Therefore, the embryo preservation protocol used in the present study was based on that developed originally for

goat embryos,⁴³ and is currently used for all breeds of goats and sheep under the aegis of the Brazilian Embryo Biobank coordinated by Embrapa.

Conclusion

Results of the present study have indicated that either short-, intermediate-, or long-term progestogen-based estrus synchronization protocols can be efficiently applied before embryo recovery using NSER in both synchronized and superovulated Morada Nova ewes, paving the way to their implementation in biodiversity conservation programs.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Author Contributions

J.F.F. is mainly responsible for study conceptualization; A.M.A., G.B.V., J.F.F., J.M.G.S.-F., L.M.F., and M.E.F.O. collected the data from experimental animals; J.F.F., M.R.B.M., M.E.F.O., and J.M.G.S.-F. discussed the study design of and analyzed the data.; S.N.E. and V.S.A.P. assisted with animal care, handling, and data collection/analysis; A.M.A. wrote the first version of the article; P.M.B. revised statistics and edited the article. All authors revised and approved of the final submitted version of the article.

Acknowledgment

The authors would like to thank Embrapa Livestock Southeast's collaborators for all their help and support during this experiment.

Author Disclosure Statement

J.F.F., J.M.G.S.-F., and M.E.F.O. are CNPq fellows. J.F.F. is also fellow of FAPEMIG and J.M.G.S.-F. of FAPERJ. All other authors have no competing financial interests.

Funding Information

The authors also thank Embrapa Goats and Sheep (Project Superovi—22.13.06.026.00.03 and 22.13.06.026.00.04) and FAPEMIG (Project CVZ-PPM 00201-17) for financial support. A.M.A. was supported by CAPES (Personnel, Finance Code 001).

References

1. Mariante AS, Egitto AA. Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* 2002;57:223–235.
2. Lobo RNB, Pereira IDC, Facó O, et al. Economic values for production traits of Morada Nova meat sheep in a pasture based production system in semi-arid Brazil. *Small Ruminant Res* 2011;96:93–100.
3. Facó O, Paiva SR, Alves LRN, et al. Morada Nova Breed: Origin, Characteristics and Perspectives [in Portuguese] (Embrapa Goats and sheep). Sobral: Embrapa Goats and Sheep Documents; 2008.

4. McManus C, Hermuche P, Paiva SR, et al. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. *Braz J Sci Technol* 2014;11:3.
5. McManus C, Facó O, Shiotsukic L, et al. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. *Small Ruminant Res* 2019;170:37–42.
6. Comizzoli P. Biotechnologies for wildlife fertility preservation. *Anim Front* 2015;5:73–78.
7. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Rep Fertil* 1999;115:111–124.
8. Figueira LM, Alves NG, Souza-Fabjan JMG, et al. Pre-ovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and nonsurgical embryo recovery. *Theriogenology* 2020;145:238–246.
9. Figueira LM, Alves NG, Maia ALRS, et al. Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. *Theriogenology* 2020;155:132–138.
10. Oliveira MEF, Zambrini FN, Souza-Fabjan JMG, et al. Repeated trans-cervical embryo recoveries in Santa inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. *Anim Reprod Sci* 2020;217:106469.
11. Lopes-Júnior ES, Maia ELMM, Paula NRO, et al. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2006;38:555–561.
12. Almeida VM, Câmara DR, Salles HO, et al. Transcervical embryo collection in sheep [in Portuguese]. *Rev Bras Reprod Anim* 2002;5:82–84.
13. Brasil OO, Moreira NH, Silva TASN, et al. Embryo production in Morada Nova and Somalis Brasileira sheep [in Portuguese]. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016;68:1390–1394.
14. Viñoles C, Forsberg M, Bancharo G, et al. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 2001;55:993–1004.
15. Fonseca JF, Torres CAA. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reprod Domest Anim* 2005;40:495–499.
16. Pietroski ACCA, Brandão FZ, Souza JMG, et al. Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. *Rev Bras de Zootec* 2013;42:168–173.
17. Fonseca JF, Oliveira MEF, Brandão FZ, et al. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: The Brazilian experience. *Reprod Fertil Dev* 2019;31:1–10.
18. Oliveira FC, Haasa CS, Ferreira CER, et al. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. *Small Ruminant Res* 2018;158:15–18.
19. Santos JDR, Ungerfeld R, Balaro MFA, et al. Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: The effectiveness and welfare implications of each technique. *Theriogenology* 2020;153:112–121.
20. Prellwitz L, Zambrini FN, Guimarães JD, et al. Comparison of the intravenous and intravaginal route of oxytocin administration for cervical dilation protocol and non-surgical embryo recovery in oestrous-induced Santa Inês ewes. *Reprod Domest Anim* 2019;54:1230–1235.
21. Dias JH, Pupin MA, Duarte GS, et al. Successful transcervical uterine flushing can be performed without or reduced dose of estradiol benzoate in cervical relaxation protocol in Dorper ewes. *Reprod Domest Anim* 2020;55:761–792.
22. Martin GB. Reproductive research on farm animals for Australia—Some long-distance goals. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:967–982.
23. Martin GB, Kadokawa H. “Clean, green and ethical” animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *J Reprod Develop* 2006;52:145–152.
24. Gonzalez-Bulnes A, Menchaca A, Martin GB, et al. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:441–452.
25. Machado LC, Oliveira VC, Paraventi MD, et al. Maintenance of Brazilian biodiversity by germplasm bank. *Pesq Vet Bras* 2016;36:62–66.
26. Leroy G, Boettcher P, Besbes B, et al. Cryoconservation of animal genetic resources in Europe and two African countries: A gap analysis. *Diversity* 2019;11:1–11.
27. Boettcher PJ, Stella A, Pizzi F, et al. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genet Sel Evol* 2005;37:657–675.
28. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Anim Reprod Sci* 2004;80:69–79.
29. Fonseca JF, Zambrini F N, Guimarães JD, et al. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. *Reprod Domest Anim* 2019;54:118–125.
30. Stringfellow DA, Givens MD. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Fourth ed. Savoy, IL: IETS; 2010.
31. Figueira LM, Alves NG, Batista RITP, et al. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. *Reprod Domest Anim* 2019;54:1493–1496.
32. Harl AW. Comparison of short-term vs. long-term estrous synchronization protocols using CIDR devices in sheep and goats during and outside the natural breeding season. MSc thesis, Kansas State University, Manhattan, KS, 2014.
33. Bartlewski PM, Beard AP, Chapman CL, et al. Ovarian responses in GnRH-treated anoestrous ewes: Follicular and endocrine correlates with luteal outcome. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:133–142.
34. Carvalho-de-Paula CJ, Souza-Fabjan JMG, Gonçalves JD, et al. Effect of a 12-h increment in the short-term treatment regimen on ovarian status, estrus synchrony, and pregnancy rate in artificially inseminated dairy goats. *Anim Reprod Sci* 2020;221:106571.
35. Menchaca A., Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:403–413.
36. Fonseca JF, Zambrini FN, Guimarães JD, et al. Cervical penetration rates and efficiency of nonsurgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. *Anim Reprod Sci* 2019;203:25–32.
37. Figueira LM, Alves NG, Maia ALRS, et al. In vivo embryo production and recovery in Lacaune ewes after imposing a superovulation treatment regimen is related to pFSH dose. *Anim Reprod Sci* 2020;223:e106625.
38. Food and Agriculture Organization (FAO). Cryoconservation of animal genetic resources. Rome: FAO Animal Production and Health Guidelines (Vol. 12); 2012.

39. Fonseca JF, Zambinia FN, Alvim GP, et al. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Res* 2013;111:96–99.
40. Maia ALRS, Arrais AM, Prellwitz L, et al. Embryo development is impaired in hydrometra-treated goats subjected to superovulation. *Vet Rec* 2020;187:e88.
41. Nascimento PMP, Santos GB, Penido AO, et al. Identification of arthritis encephalitis caprine (CAEV) in flushing media and embryos from naturally infected herd goats. *Anim Reprod* 2015;12:703.
42. Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, et al. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 2016;86:144–151.
43. Fonseca JF, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, et al. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2018;70:1489–1496.
44. Morais MCC, Esteves LV, Souza-Fabjan JMG, et al. Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route. *Small Ruminant Res* 2020;192:e106215.
45. Figueira LM, Alves NG, Batista RITP, et al. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. *Reprod Domest Anim* 2019;54:1493–1496.
46. Brair VL, Maia ALRS, Correia LFL, et al. Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. *Cryobiology* 2020;95:110–115.

Address correspondence to:
Jeferson Ferreira da Fonseca, PhD
Embrapa Caprinos e Ovinos
Rodovia MG 133, Km 42
Cep 36155-000, Coronel Pacheco, MG
Brazil
E-mail: jeferson.fonseca@embrapa.br