UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovinos

VALDIR MORAIS DE ALMEIDA

Garanhuns - PE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovinos

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Valdir Morais de Almeida

Garanhuns-PE
2013

Ficha catalográfica

A447e Almeida, Valdir Morais de
Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovino / Valdir Morais de Almeida. – Recife, 2013.
86 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.
. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s)..

1. MOTE 2. Ovinos 3. Laparoscopia I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovinos

VALDIR MORAIS DE ALMEIDA

Aprovado em 29 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAG

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Universidade Federal de Campina Grande - CSTR

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV

Prof. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UAG

Gabriela Almeida, por quem emana meu
verdadeiro e incondicional amor!

Ao forte e mui digno **produtor rural nordestino**,
...espectador de nossas respostas.

DEDICO.

“Daria tudo que sei por metade do que ignoro”

René Descartes

RECONHECIMENTOS

Não se trata de um agradecimento apenas, mas de um verdadeiro e sincero reconhecimento de que nada teria sido se não tivéssemos alcançado a compreensão, o incentivo, e os muitos conselhos daqueles cujas vidas cheias de amor, bondade, compaixão e humanismo, refletiram em nós, raios de esperança de que é possível... e, verdadeiramente, é possível vencermos...

Diante desta vitória, assumo uma grande dívida de gratidão para com todos que foram, incrivelmente, pacientes e compreensíveis em permitir que o papai, marido, filho, irmão, colega, aluno, orientado, profissional e, o amigo, encurtasse o tempo de convívio, e tantas vezes, a própria compreensão, afeto e o semblante ameno.

Dificilmente me permitiria de ocorrer no erro e na injustiça de deixar no anonimato ou até mesmo de excluir alguém dentre os que sejam dignos de meus sinceros votos de gratidão e reconhecimento ao pouco ou muito que se fizeram em prol desta caminhada que culminou com o desenvolvimento deste rico trabalho e com o grande aprendizado e experiência adquirida. Desta feita, sintam-se incluídos neste vasto rol, todos aqueles cujas vidas ladearam a minha, nos diversos momentos, e assim, cada um a seu modo, com suas formas, forças, energias, estímulos e proteção, permitiram-me alcançar esta sublime graça.

Ademais, e na primazia de tudo, ao **Grande Arquiteto do Universo**, fonte fecunda de luz, de felicidade e de virtude, o Trino Deus, Pai das Luzes e Senhor nosso, por ter concebido minha existência e por tão grande amor, misericórdia e graça.

Sou grato!!!

∴ ∴ ∴

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **viii**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **ix**

RESUMO ..... **x**

ABSTRACT ..... **xi**

CAPÍTULO I - Referencial Teórico **12**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. REVISÃO DE LITERATURA **15**

2.1. Fisiologia da reprodução **15**

2.1.1. Ciclo estral **15**

2.1.2. Dinâmica folicular ovariana **16**

2.2. Múltipla ovulação e transferência de embriões – MOTE **17**

2.3. Inseminação Artificial em tempo fixo por laparoscopia **20**

2.4. Momento da ovulação em IATF **21**

2.5. Colheita e transferência de embriões **24**

3. OBJETIVOS **26**

3.1. Geral **26**

3.2. Específicos **26**

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **27**

CAPÍTULO II - Momento da ovulação em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões. **34**

1. RESUMO **36**

2. ABSTRACT **37**

3. INTRODUÇÃO **38**

4. MATERIAL E MÉTODOS **40**

5. RESULTADO E DISCUSSÃO **41**

6. CONCLUSÕES **44**

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA **45**

CAPÍTULO III - Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões. **48**

1. **RESUMO** **50**
2. **ABSTRACT** **51**
3. **INTRODUÇÃO** **52**
4. **MATERIAL E MÉTODOS** **54**
5. **RESULTADO E DISCUSSÃO** **57**
6. **CONCLUSÕES** **60**
7. **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA** **60**
8. **ILUSTRAÇÕES** **64**

5. **CONCLUSÃO** **65**
6. **APÊNDICES** **66**
7. **ANEXOS** **76**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Referencial Teórico

CAPÍTULO II - Momento da ovulação em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões.

TABELA 1 Momento da ovulação observado por laparoscopias seriadas em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões, expresso em porcentagem de fêmeas . **42**

CAPÍTULO III - Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões.

TABELA 1 Índice de produção de estruturas embrionárias totais, não fertilizadas, degeneradas, viáveis (embriões) e, confirmadas por ultrassonografia, colhidas pela técnica de laparotomia em ovelhas submetidas a programa comercial de múltipla ovulação e transferência de embriões. **64**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CIDR	"Controlled internal drug release"
CL	Corpo Lúteo
cm	Centímetros
D	Dia
DPBS	Dulbecco phosphate buffer solution
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina menopausal humana
IA	Inseminação artificial
IAL	Inseminação artificial laparoscópica
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
Kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	Miligramas
MHZ	Mega-Hertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embrião
n	Número de animais por grupo
nº	Número
ºC	Graus Celsius
P4	Progesterona
pFSH	Hormônio folículo-estimulante de origem suína
TE	Transferência de embriões
UI	Unidade Internacional
µg	Microgramas

RESUMO

Os resultados pouco previsíveis e a eficiência variável da transferência de embriões (TE) em ovinos podem estar relacionados à ausência da definição do melhor momento da IA em programas de TE por assincronia entre as ovulações e os procedimentos da inseminação artificial (IA) em animais superovulados. Desta feita, buscou-se identificar o momento da ovulação, por meio da laparoscopia, de fêmeas ovinas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões-MOTE e, a partir destes conhecimentos, avaliar dois momentos da IA laparoscópica, com uso de sêmen resfriado e criopreservado. No experimento 1, dez fêmeas ovinas foram utilizadas, sincronizadas com uso de dispositivo vaginal de Progesterona (CIDR®) (D0) e indução da superovulação por administrações de FSH-p (Folltropin®), em oito doses decrescentes a cada doze horas, iniciando-se no D12. No D15 foram removidos os dispositivos intravaginais e administradas 200UI de gonadrotofina coriônica eqüina - eCG (Novormon®, Intervet). No dia seguinte, administrou-se 4μg de acetato de buserelina - GnRH (Conceptal®, Intervet). Após detecção do cio e jejum de 12 horas, foram realizadas as observações do status ovariano via laparoscópica, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas pós-remoção do CIDR® ou até observação das ovulações. No experimento 2, vinte fêmeas ovinas foram utilizadas, sincronizadas e induzidas com protocolo idêntico ao do experimento 1 e, após detecção do cio e jejum de 12 horas, foram divididas em quatro tratamentos definidos quanto ao horário da IAL com base na remoção do dispositivo intravaginal e quanto ao tipo de sêmen utilizados: T1 – 36 h / sêmen resfriado; T2 – 48 h / sêmen resfriado; T3 – 36 h / sêmen criopreservado e; T4 – 48 h / sêmen criopreservado. Passados cinco dias da IAL, foi realizada a colheita dos embriões pela técnica de laparotomia e, as estruturas recuperadas foram avaliadas e classificadas segundo normas preconizadas pela IETS (*International Embryo Transfer Society*) e, transferidos para receptoras que tiveram estro sincronizado por meio da aplicação de dispositivo intravaginal impregnado com 60 mg de medroxiprogeterona – MAP (Progespon®), por um período de 15 dias, quando se deu a sua retirada e aplicação de 400UI de eCG (Folligon®) por via intramuscular e, receberam embriões pela técnica de semi-laparoscópia. O diagnóstico gestacional foi realizado por meio de ultrassonografia aos 35 dias após a TE. Observou-se maior concentração (90%) do momento das ovulações às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal. Cinquenta e duas horas pós-remoção do dispositivo intravaginal, todas as fêmeas do programa haviam ovulado. No segundo experimento, O número de estruturas viáveis, do T1 e T2, não variou significativamente, entretanto, aumento significativo ($P<0,05$), foi observado no percentual de confirmações de prenhezes entre os tratamentos, T3 = 9,1 ± 13,3 % e T4 = 49,2 ± 30,1 %, demonstrando que o uso da IAL com sêmen criopreservado, na condição de pré-ovulação (36 h), não foi eficaz na fertilização das estruturas oócitarias. Observou-se que uma única IAL, foi suficiente para produção embrionária, com exceção do T3, alcançando-se melhores índices no T4, com fertilização de 62,5 ± 39,3 %, e confirmação ultrassonográfica de 49,2 ± 30,1 %, das estruturas produzidas. Conclui-se que fêmeas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais, sendo possível indicar a utilização de uma única IAL com uso sêmen resfriado e, criopreservado em programas comerciais de MOTE em ovinos, evidenciando considerável ganho tecnológico e econômico.

Palavras-chaves: MOTE; Laparoscópia; Dinâmica ovulatória; Ovino; Embrião; Sêmen

ABSTRACT

The unpredictability of results in addition with a variable efficiency on embryo transfer (ET) in sheep can be related to the absence of timing definition on artificial insemination (AI) in ET programs by an asynchrony between ovulations and AI procedures in superovulted animals. The aim of this work, was to identify by laparoscopy the ovarian dynamics of ewes subjected to multiple ovulation embryo transfer program (MOET) and, based upon this knowledge, evaluate two ideal moments of laparoscopic AI, with cooled and frozen semen. In experiment 1, ten females, sheep were used, synchronized with intravaginal progesterone device (CIDR ®) (D0) and Superovulation induction by FSH-p (Folltropin ®), in eight decreasing administration doses every twelve hours, starting at D12. In D15 intravaginal devices have been removed and administered 200IU of equine chorionic gonadrotophin - eCG (Novormon ®, Intervet). The next day, 4μg of buserelin acetate – GnRH - was administered (Conceptal ®, Intervet). After estrous detection, observations of ovarian status laparoscopically were performed at 36, 40, 48, 52 and 56 hours after CIDR removal or until ovulations occurred. In experiment 2, twenty sheep females were used, synchronized and induced with identical protocol of experiment 1 and, after estrous detection, they were divided into four treatments defined as at the time of the Laparoscopic AI based upon removal of intravaginal device and on the type of semen used: T1-36 h/cooled semen; T2-48 h/cooled semen; T3-36 h/frozen semen and; T4-48 h/frozen semen. Five days after laparoscopic AI, collection of the embryos was performed by laparotomy and the recovered structures were evaluated and classified according to IETS (International Embryo Transfer Society) and transferred to recipients that had synchronized estrus by applying intravaginal device impregnated with 60 mg medroxiprogeterona-MAP (Progespon ®), for a period of 15 days, when the device was removed and 400UI of eCG (Folligon ®) was administered subcutaneously and embryos were transferred by semi-laparoscopy. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography days after ET. There was a higher concentration (90%) of the time of ovulation at 48 hours after the device removal. At Fifty-two hours after device removal, all females from the experiment had ovulated. In the second experiment, no differences were seen in number of structures recovered among treatments with a mean of 11.15 ± 6.35. The number of viable embryos differed statistically between the T2 (8.4 ± 5.5) and T3 (4.0 ± 4.4), showing that cryopreserved sperm cell was not able to accomplishing fertilization when the laparoscopic AI was held at 36 h. It was concluded that females subjected to MOET show a fast follicular growth and ovulations occurred mostly 48 hours after Progesterone device removal. It is possible to suggest a single laparoscopic AI in commercial MOET programs in sheep. It was showed also a numerical superiority, when using cooled semen.

Keywords: MOET; Laparoscope; Follicular Dynamics; Sheep; Embryo; Semen

Capítulo I

Referencial Teórico

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas de transferência de embriões correlacionados com o momento da ovulação em ovinos

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura, racionalmente explorada e conduzida em sintonia com os aspectos ambientais, econômicos e sociais, é sem dúvida uma excelente alternativa para os diferentes ecossistemas existentes no Brasil, e mesmo em regiões onde as condições edafoclimáticas são adversas ao longo do ano, como a semi-árida nordestina, é evidenciada sua adaptação (SIMPLÍCIO, 2001).

O Nordeste do Brasil, tradicional e vocacionado produtor de pequenos ruminantes, vivencia trágico momento de estiagem que vem comprometendo demasiadamente a produção animal e o fornecimento de produtos de mesma origem aos centros consumidores, o que remete-nos a necessidade de maiores investimentos tecnológicos em espécies que apresentam-se adaptadas e com maior resistência a essas desfavoráveis condições edafoclimáticas.

Em virtude da importância da ovinocultura para o Brasil, em particular para a região Nordeste, esta atividade requer atenção especial para que possa desenvolver-se à altura desta importância. Entretanto, desafios de diversas ordens são verificados (LOBO, 2002).

A crescente valorização de espécie ovina tem motivado a busca da multiplicação de indivíduos com características zootécnicas e geneticamente desejáveis para a produção. Dentre as técnicas utilizadas, que possibilitam essa multiplicação, a transferência de embriões (TE), que ao lado da inseminação artificial (IA), podem contribuir para um aumento da produção animal (RIGOLON et al., 1999). Tais ferramentas podem vir a serem as principais alternativas tecnológicas na multiplicação de rebanhos produtores de leite e carne, quando da reposição do efetivo perdido em avassaladores períodos de estiagem como o que se convive na atualidade em todo território do Nordeste brasileiro.

Dentre as técnicas atualmente utilizadas para a realização da IA em ovinos, a que tem apresentado os melhores índices de fertilidade é a laparoscópica (MYLNE et al., 1997; SALAMON; MAXWELL, 2000), a qual embora seja uma intervenção cirúrgica e requeira material sofisticado e mão-de-obra especializada, é a biotécnica reprodutiva que oferece os melhores resultados de concepção em ovinos devido à deposição do sêmen ocorrer diretamente nos cornos uterinos (MAXWELL et al., 1986).

A determinação exata do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação, já que o oócito tem duração de vida fértil muito curta, 12 a 24 horas (EVANS; MAXWELL, 1987). Assim, o objetivo em se proporcionar o encontro do espermatozóide com o oócito no momento em que este se encontre viável, a nível de oviduto, é influenciado pela opção

por um determinado método de sincronização, técnica de inseminação e tipo de sêmen (fresco ou criopreservado), conferindo variações nos resultados de fertilidade (MYLNE et.al.,1997).

A TE, considerada tão importante para a fêmea, quanto a IA é para os machos, apresenta alguns entraves que limitam sua difusão na espécie ovina, como: dificuldades da técnica, custo elevado, eficiência variável e pouco previsível (SIMPLÍCIO et al., 2005; BALDASSARE; KARATZAS, 2004), horário da ocorrência da ovulação após a sincronização do estro (DONOVAN et al., 2000) e, ausência da definição do melhor momento da IA visando a fertilização *in vivo* (ALMEIDA et al., 2011),o que poderia ser reduzido melhorando-se a sincronia entre as ovulações e os procedimentos de IA em animais superovulados. (MENCHACA et al., 2010).

A partir do conhecimento da dinâmica folicular e, do momento da ovulação, torna-se possível incrementar os resultados da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), ou seja, com tempo pré determinado, alcançando-se, desta forma, o melhor momento da deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, incrementado-se a utilização da IA e TE, consequentemente, contribuindo para o melhoramento genético, eficiência reprodutiva e produtividade do rebanho nacional (ALMEIDA et. al., 2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia da reprodução em ovinos

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um conjunto complexo de mecanismos e fenômenos que obedecem a rígido controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se interrelacionam, utilizando avançada linguagem bioquímica. A compreensão desse universo ainda é restrita, porém nos últimos anos, a velocidade da aquisição de conhecimento se acelerou e, como conseqüência, as biotécnicas aplicáveis à reprodução sofreram evolução e se diversificaram (BICUDO, 1999).

2.1.1. Ciclo Estral

O ciclo estral é resultado da ação coordenada do hipotálamo, da hipófise, dos ovários e do útero, mediada principalmente por mecanismos hormonais que envolvem o GnRH (hipotálamo), LH e FSH (hipófise), estradiol e progesterona (ovário) e prostaglandina F2α (útero) (GONZALEZ, 2002, apud ZAMBRINI, 2006). Caracterizando-se pela repetição sucessiva de um conjunto de eventos e, em ovinos, com duração de 17 ± 2 dias, dividindo-se em fase luteal – estende-se desde o dia 2 (estro = dia 0) até o dia 13, e fase folicular – compreende o dia 14 até o dia 1 (RUBIANES, 2000). Definido também como o intervalo entre dois estros consecutivos.

O ciclo estral dos ovinos ocorre desde animais que apresentam-se tipicamente monoestrais (apresentam um único ciclo), até o mais elevado grau de poliestrismo (vários ciclos sexuais). Existem ovinos de ciclo estacional (ocorrem em determinadas estações do ano) e ovelhas que ovulam o ano todo. A variação se dá em função da raça, do ambiente e da alimentação (CUNHA et al., 2001).

Durante a fase folicular têm-se os hormônios gonadotróficos, FSH e LH, secretados pela hipófise, que controlam o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese, culminando na secreção de estrógenos responsáveis pelo comportamento do estro (receptividade sexual), que nesta espécie dura 24-36 horas, com a ovulação acontecendo nas últimas 12 horas do estro (FONSECA, 2005).

A foliculogênese tem início com a formação dos folículos durante a vida fetal, de forma que, ao nascer, o número de folículos primordiais presentes nas gônadas, já é definido. A maioria

desses folículos durante o seu crescimento vai se degenerar no processo conhecido como atresia folicular, enquanto, apenas uma minoria vai completar sua maturação e ovular (COSTA, 2007).

Estudos revelam que ovelhas em anestro apresentam freqüência nos pulsos de GnRH diminuídos pela baixa concentração de estradiol circulante (KARSCH et al., 1993). Os folículos atingem tamanhos pré-ovulatorios, mas entram em atresia em virtude das flutuações de concentrações plasmáticas de FSH (BARTLEWSKI et al., 1998; KARSCH et al., 1993). Ao final do anestro estacional, a frequência e a amplitude dos pulsos de LH são reestabelecidos, em virtude de cessarem os mecanismos que as mantinham baixos e, O LH volta a estimular a produção de estrógeno nos folículos ovarianos, com retorno do primeiro pico pré-ovulatório de LH (KARSCH et al., 1988). E ovulação de um ou mais folículos e, luteinização da estrutura folicular remanescente, formando o corpo lúteo (RUBIANES, 2000).

2.1.2. Dinâmica Folicular Ovariana

O desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas, bem como o aperfeiçoamento das já existentes, necessitam invariavelmente, do conhecimento da dinâmica folicular ovariana (DRIANCOURT, 1991).

Dinâmica folicular é um processo contínuo que permite o desenvolvimento dos folículos antrais até fase pré-ovulatória (LUCY et al., 1992), ocorrendo em ondas de crescimento e regressão de folículos antrais (LASSALA et al., 2004).

Nos pequenos ruminantes, o desenvolvimento folicular ocorre em ondas que emergem com intervalo de 4 a 6 dias, durante a estação reprodutiva e o anestro sazonal (RUBIANES, 2000), caracterizadas pela emergência de um grupo de pequenos folículos antrais, dos quais um ou dois chegarão ao diâmetro mínimo de 5mm (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

O número de ondas foliculares por ciclo, varia entre duas e quatro em ovinos (VINOLES et al., 2002) e quatro e seis em caprinos (BALDASSARRE et al., 2002), com altas variações individuais, sendo mais frequentes três ondas foliculares em ovinos e cinco em caprinos. A emergência de uma segunda onda, ao que parece, só acontece após a atresia dos folículos da onda antecedente e, em estudo realizado por Evans et al. (2000) coincidiu com o término da fase estática do maior folículo da primeira onda.

O dia de emergência de cada onda folicular é variável na espécie ovina e, depende do número de ondas em cada ciclo. A previsão do dia da emergência de cada onda folicular é, portanto, muito difícil, com exceção da primeira onda do ciclo. Todos os estudos em caprinos e

ovinos relatam que a primeira onda emerge em torno do dia da ovulação (Dia 0) do ciclo anterior (BRANDÃO, 2010).

Duggavathi et al., (2005), observou fortes evidências experimentais indicando que durante a primeira e a última onda folicular (ovulatória) ocorre um mecanismo denominado dominância, ou seja, um folículo de um pool de recrutados é selecionado, continua seu crescimento enquanto os outros entram em atresia, o folículo maior de uma onda será o folículo ovulatório se conseguir estabelecer uma cascata endócrina com o LH que resulte em um pico préovulatório de LH.

Três eventos podem ser observados durante uma onda folicular - o recrutamento, a seleção e a dominância – e sofrem influência das gonodotrofinas hipofisárias, FSH e LH, que estão diretamente ligadas à manifestação, manutenção e suspensão de tais eventos (ZAMBRINE, 2006).

Em cada onda folicular um recrutamento de pequenos folículos pré-antrais emerge em resposta à elevação da concentração plasmática de FSH. Ao menos um desses folículos é selecionado e continua a crescer, enquanto os outros entram em atresia. Entre o folículo selecionado e o eixo hipotálamo-hipofisário é estabelecida uma retroalimentação hormonal positiva que resulta na ovulação (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Este fato ocorre, segundo Viñoles, 2003, por meio da expressão de receptores de LH nas células da granulosa, em virtude do suporte de FSH e da grande quantidade de estradiol secretado pelo folículo, elevando o folículo ao diâmetro aproximado de 3-5mm, ou seja, Pré ovulatório.

Ocorrendo a ovulação, ocorre o rompimento do folículo e a proliferação dos vasos sanguíneos da teca interna e o preenchimento da cavidade folicular, dando origem ao corpo hemorrágico. Fatores angiogênicos são descritos como envolvidos nesta vascularização (DAVIS et al., 1996) Após 4-5 dias da ovulação, o corpo hemorrágico transforma-se no corpo lúteo (EVANS; MAXWELL, 1987).

2.2. Múltipla ovulação e transferência de embriões - MOTE

A múltipla ovulação seguida de TE é uma técnica considerada tão importante para as fêmeas, quanto a IA é para os machos, apresentando-se como uma biotecnologia de reprodução assistida atual, em plena atividade e, com crescimento no aprimoramento de execução em todas as suas etapas no Brasil. Representa uma capacidade exequível na rápida multiplicação de animais portadores de características zootécnicas desejáveis, por meio do incremento de aproveitamento de uma fêmea durante a sua vida reprodutiva (FONSECA et al., 2010).

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da monta natural ou IA, colheita dos embriões por meio de lavagem uterina e posterior transferência (inovulação) dos embriões a fêmeas receptoras (REICHENBACH et al., 2002). Dessa forma, possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva, impactando os programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como, no resgate e conservação de raças ameaçadas de extinção e no apoio a outras biotécnicas relacionadas.

A superovulação constitui o inicio do processo dos programas de MOTE, onde gonadrotofinas exógenas são administradas com o objetivo de aumentar o número de folículos maturados e, sua consequente ovulação com a expectativa de geração de embriões viáveis.

Na maioria dos casos, sua aplicação comercial apresenta taxa de ovulação após procedimentos de superovulação altamente variáveis, e em termos de sucesso, as taxas de fertilização *in vivo*, e de embriões recuperados e transferidos, são frequentemente difíceis de serem prognosticadas. Com eficiência variável e pouco previsível, destacando-se como uma biotécnica que apresenta baixa repetibilidade em seus resultados (SIMPLÍCIO et al., 2005; BALDASSARE; KARATZAS, 2004; apud FONSECA et al., 2010).

Baldassare (2008), em suas observações sobre MOTE em pequenos ruminantes, afirmam ser esta a biotecnologia da reprodução assistida mais frustrante, uma vez que os resultados podem variar do fracasso total ao sucesso absoluto sem variação alguma no padrão das metodologias utilizadas.

Os tratamentos hormonais utilizados para se chegar ao aumento na taxa de ovulação baseiam-se na suplementação com gonadrotofinas naturais administradas durante a fase folicular do ciclo estral, tais como FSH (ALMEIDA et al., 2002), o hCG (EVANS; MAXWELL, 1987), ou as gonadrotofinas placentárias como o eCG (JABBOUR; EVANS, 1991).

É sabido que o tratamento superovulatório não destina-se a promover o desenvolvimento folicular, entretanto, fornece aqueles folículos que normalmente se tornariam atrésicos, um meio hormonal adequado para que continuem seus processos de maturação, culminando com a ovulação (DINIZ et al., 1999).

Durante um ciclo estral normal, um a quatro folículos podem alcançar diâmetro ovulatório ≥ 5mm (GINTHER; KOT, 1994; DESHPANDE et al., 1999; EVANS, 2003). Estes folículos estabelecem sua dominância, dentre outros aspectos, privando os demais folículos (subordinados) do hormônio folículo estimulante (GINTHER et al., 1996). Logo se entende

como princípio básico da superovulação, o fornecimento de grandes quantidades de FSH, levando a ovulações múltiplas. Com base neste princípio, o tratamento superovulatório é realizado mediante aporte de altas doses de gonadotrofinas exógenas, como FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina menopausal humana (hMG) (OLIVEIRA et al. 2009).

Diversos protocolos superovulatórios, comercialmente utilizados, em programas de TE em pequenos ruminantes, apresentam-se com relativo sucesso na obtenção de múltiplas ovulações, por meio de administração sucessivas de FSH, em 8 doses decrescentes e intervaladas por 12 horas, tendo início no dia 12 do protocolo (ALMEIDA et al., 2011).

Dentre uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, a alta variabilidade das respostas à estimulação ovariana é, evidentemente, o maior impasse frente ao aumento da eficiência dos programas para superovulação em ovinos. Especula-se que esta heterogeneidade nos resultados estimulatórios, em ovinos, decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral, e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular (OLIVEIRA, 2011a) Contudo, preparações hormonais que variam no número de aplicações e na dose dos hormônios utilizados têm reportado sucesso (FONSECA et al., 2010; ALMEIDA, et al., 2008b; ALMEIDA et al., 2011).

Fonseca et al. (2005) citando (GORDON, 1997; LOI et al., 1998; PINTADO et al., 1998; ARMSTRONG et al., 1983; COGNIÉ et al., 2003; SELVARAJU et al., 2003), relatam as várias estratégias desenvolvidas objetivando a elevação do número de embriões viáveis coletados de ovelhas superovuladas, tais como: administração de eCG e anti-eCG; uso de FSH em associação ou em substituição ao eCG; inclusão de GnRH ou GnRH-antagonista; insulina; e ou hormônio do crescimento.

A utilização do eCG em protocolos superovulatórios entrou em desuso por sua alta capacidade em promover folículos anovulatórios e, estimular a produção de anticorpos anti-eCG, promovendo a ausência da ovulação e comprometimento na fertilidade (LÓPEZ-SEBASTIÁN et al., 2006; ROY et al., 1999).

Grande melhoria na eficiência dos programas de superovulação para produção *in vivo* de embriões tem sido observada nas últimas décadas pela substituição do eCG por preparados de FSH de origem suína, ovina ou caprina (OLIVEIRA, 2011a). Com este hormônio se obtêm taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, além de resposta individual mais uniforme quando comparado aos tratamentos com eCG (ARMSTRONG; EVANS, 1983).

O comportamento reprodutivo estacional implica na necessidade do uso de progestágenos. Normalmente, utilizam-se dispositivos vaginais ou auriculares com um tempo de exposição superior a 10 dias e as aplicações de gonadotrofinas são iniciadas 48 a 72 horas antes da remoção do dispositivo (GORDON, 1997; GREYLING et al, 2002, apud FONSECA, et al., 2005).O FSH exógeno começa a atuar sobre a população de folículos presente nos ovários das ovelhas entre 12 e 24 horas após o início do tratamento. Após 48 horas, se observa crescimento de folículos de 2 a 5 mm. Os folículos em crescimento alcançam o tamanho pré-ovulatório entre 36 e 60 horas, e chegam à ovulação entre 48 e 60 horas (GONZÁLEZ-BULNES et al., 1997).

Alguns avanços necessitam serem dados no sentido de um melhor esclarecimento quanto a influência da condição folicular ovariana no início do protocolo de superovulação. Acredita-se que há um efeito prejudicial da dominância folicular na resposta superovulatória em pequenos ruminantes. Segundo Rubianes et al. (1997), a presença de folículos dominantes (maiores que 5-6 mm) no início do tratamento com FSH parece afetar a maturação e a ovulação dos folículos menores. Esta seria uma das possíveis justificativas para a alta frequência de folículos anovulatórios em tratamentos superovulatórios destes animais. Para Menchaca et al. (2010), esta evidência reforça a necessidade de garantir a ausência de folículos grandes no início da superovulação, entretanto a imprevisibilidade do dia da emergência de cada onda folicular, nesta espécie, reporta ao questionamento de como sincronizá-la.

Oliveira, (2011a) citando (RUBIANES; MENCHACA, 2006; MENCHACA et al.,2007; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004), relata algumas estratégias focadas em se começar o tratamento superovulatório na ausência de um folículo dominante, isto é, próximo a emergência da onda folicular, em pequenos ruminantes, destacando-se: (1) protocolo “Dia 0”, no qual se emprega a pré-sincronização do estro e superestimulação da primeira onda emergente (2) tratamentos com antagonistas do GnRH antes da superestimulação gonadotrófica, o qual pode ser uma alternativa para eliminar o folículo dominante.

2.3. Inseminação artificial em tempo fixo por laparoscopia

A fertilização dos óvulos produzidos por meio de uma boa resposta superovulatória, poderá ser alcançada com o uso da cobertura natural, pouco usada em programas comerciais devido aos baixos índices de fertilização alcançados, ou pela IA com observação de cio e, comumente utilizada, pela inseminação artificial em tempo fixo – IATF por meio da Laparoscopia – IAL, permitindo a visualização do útero através de uma pequena incisão na cavidade abdominal, de forma a driblar a barreira cervical, uma vez que o sêmen é colocado

diretamente na luz uterina. Lucidi et al. (2001), relatam que com esta técnica é possível depositar o sêmen próximo ao local da fertilização minimizando o problema da baixa motilidade e viabilidade pós descongelamento, observados como uma das maiores causa da baixa fertilidade. Em adição, Traldi (2008), recomenda que ovelhas superovuladas sejam inseminadas através de laparoscopia, com deposição do sêmen na porção mais cranial dos cornos uterinos, facilitando e favorecendo a fecundação.

Segundo Almeida et al. (2008a) e Medeiros et al. (2002), A IATF por via laparoscópica, garante índices satisfatórios de fertilidade mesmo quando de sua realização a campo. Os mesmo autores evidenciam dois momentos distintos na utilização comercial da inseminação artificial, apontando a IAL como um divisor de águas no incremento dos resultados de fertilidade em programas comerciais.

Vários autores (KILLEN; CAFFREY, 1982; MEDEIROS et al., 2002; ALMEIDA et al., 2008a; MYLNE et al., 1997), reportam-se a IATF laparoscópica, como a que apresenta os melhores índices de fertilidade em pequenos ruminantes, a qual, embora seja uma intervenção semi-cirúrgica e requeira material e mão-de-obra especializados, supera as demais técnicas por depositar o sêmen diretamente nos cornos uterinos, e desta forma, alcança índices de fertilidade superior as demais técnicas.

O sêmen para uso em IATF pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser utilizado fresco, resfriado ou criopreservado. O uso do sêmen resfriado tem se tornado uma excelente opção em virtude do surgimento de grandes centrais de sêmen, as quais apresentam rígido controle de qualidade e, disponibilidade de excelente material genético, além de estarem sob supervisionamento constante do Ministério da Agricultura. O sêmen criopresenvado, apesar de sofrer maiores injúrias pelo processo de diluição, resfriamento, congelação e descongelação, é a opção comercialmente mais utilizada por apresentar inúmeras vantagens quanto ao tempo de estocagem, preservação de material genético de animais já mortos, transporte entre grandes distâncias, entre outros.

2.4. Momento da ovulação em IATF

Observa-se que um dos grandes fatores que limitam o emprego da IA, é a relação entre o tempo de vida útil da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e a ovulação, tornando-se particularmente crítico quando do uso de IA com sêmen congelado (ALMEIDA, et al., 2011; FREITAS; SIMPLÍCIO, 2002). Segundo Oliveira (2011b), O momento recomendado para realizar a IATF é discutível, visto o desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as

ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos hormonais disponíveis. Todavia, Almeida et al. (2011) observaram que, em animais expostos a um controle hormonal, há a necessidade de se determinar o momento em que ocorre a ovulação e consequentemente qual seria o tempo ideal para executar a deposição de sêmen no trato genital da fêmea, com o intuito de estabelecer um protocolo de IATF, como acontece na espécie bovina.

Em adição, Evans e Maxweel (1987); Mylne et al. (1997), consideram a determinação exata do momento da ovulação como crucial para o sucesso da IA, visto que o oócito tem uma duração de vida fértil muito curta, 12 a 24 horas. Em assim sendo, o objetivo maior é que o espermatozóide atinja o oviduto no momento em que ali exista um oócito viável. Entretanto, a determinação do momento ótimo para a IA, bem como os resultados de fertilidade, estão influenciados pela determinação da técnica de IA utilizada, o tipo de sêmen (fresco ou congelado) e o método de sincronização ou utilização do cio natural.

O momento da ovulação em programas de IATF, definido em horas, como o tempo decorrido entre a retirada do dispositivo vaginal de progesterona e a ovulação propriamente dita, sofre variações em decorrência a fatores como estação do ano, idade do animal, estado nutricional e fisiológico, tipo do dispositivo intravaginal, tratamento superovulatórios, uso ou não do eCG e GnRH ao final do tratamento superovulatório, entre outros (ROMANO et al., 1996; ALMEIDA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2008). É importante ressaltar que em protocolos onde é administrado GnRH ao final do tratamento superovulatório, ocorre a modificação do momento ovulatório, informação que deve ser considerada quando do uso da IATF nestes animais (OLIVEIRA et al., 2008a; 2008b). Observação semelhante foi descrita por Reyna et al. (2005), quando administraram GnRH 36 horas após a retirada do progestágeno, antecipando a ovulação em comparação ao grupo controle.

Protocolos com GnRH têm mostrado resultado com alta sincronização do momento da ovulação. Essa sincronia provavelmente contribui para melhorar a produção de embriões devido a melhora na taxa de fertilização dos oócitos. O uso do GnRH em programas de colheitas de oócitos ou embriões pode ser recomendado, quando tempo pré-fixado de inseminação é usado (HARESIGN et al., 1996). Em adição, Naqvi et al., (2001) demonstraram que o uso de GnRH associado a protocolos de superovulação em ovelhas, aumentou a eficiência ovulatória.

Em estudos de dinâmica ovariana realizados em ovelhas submetidas a programa de MOTE, observou-se maior concentração do momento das ovulações às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal, demonstrando que a IA em ovelhas superovuladas deverá ocorrer por volta das 40 e 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal. Observou-se, ainda, que o

momento das ovulações em fêmeas superovuladas, nas referidas condições, ocorreram em período anterior quando comparados com os protocolos de sincronização de estro comumente utilizados. (ALMEIDA et al., 2011). Este resultado elucida que fonte exógena de FSH recruta previamente folículos que entrariam em atresia e favorece o rápido crescimento destes (BRAILEANU et al., 1998). Consequentemente, a antecipação da ovulação é esperada em fêmeas expostas ao tratamento de superovulação em comparação às fêmeas que não recebem estímulo de FSH exógeno (ALMEIDA et al., 2011).

Evans e Maxwell, (1987), relatam que em fêmeas superovuladas, o intervalo entre a remoção do progestágeno e a IA intra-uterina por laparoscopia deve ser de 36 a 48 horas, para sêmen fresco, e de 44 a 48 horas para sêmen congelado. Segundo Gusmão (2006), a primeira IATF laparoscópica deve ser realizada 36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona.

Estudos realizados com a utilização da IA laparoscópica, com sêmen resfriado, as, 24, 44, 64 horas após a remoção do progestágeno em ovelhas superovuladas com a utilização de MAP e eCG, obteve-se valores correspondentes de 46, 98 e 26%, respectivamente (JABBOUR; EVANS 1991).

Fonseca et al. (2005), recomenda a realização de duas a três repetição de IA, intervaladas de 12 horas, tendo em vista à assincronia entre as ovulações de folículos de um mesmo animal.

Observou-se que quando da utilização de sêmen congelado na TE, foram necessárias mais de uma dose inseminante em diferentes momentos de aplicação, tendo em vista a dificuldade de se estabelecer o momento ideal da IA em animais superovulados (TABET, 2007). Variações neste momento foram observados de acordo com o protocolo utilizado e principalmente quando se adicionou ao tratamento indutores de ovulação, tais como: GnRH, LH e hCG (OLIVEIRA, 2011). Estas variações são motivos de estudo que relacionam dinâmica ovulatória e IATF em animais submetidos a programa de MOTE (ALMEIDA et al.,2011).

Bicudo et al. (2007), utilizando sêmen congelado em IA e TE, concordaram com D'Álessandro et al. (2005) quando esse referencia a falha da fertilização após superovulação como uma das principais causas do insucesso da TE. Os mesmos autores ressaltaram ainda a necessidade de ponderar o tipo e a qualidade do sêmen utilizado, além do local de deposição dos espermatozóides para se obter o maior sucesso em programas de TE. Em adição, GILLAN et al. (2004), tornou evidente que o sêmen criopreservado afeta de forma significativa diversos atributos espermáticos, como a motilidade, atividade respiratória, status de membrana e

qualidade de DNA. Consequentemente, a viabilidade espermática diminui alterando o tempo e a taxa de fertilização, comparados com espermatozóides a fresco.

2.5. Colheita e transferência de embriões

A TE é um método de reprodução assistida que associa diversas biotecnologias e possibilita a multiplicação acelerada de indivíduos geneticamente superiores, sendo solução para diferentes objetivos de ordem genética, sanitária e, comercial (BARIL, 1995, apud GONZALEZ, 2005). Pode ser realizada com a utilização de uma das três técnicas comercialmente difundidas, Transcervical, (ALMEIDA et al., 2002); Laparoscópica (ISHWAR; MEMON, 1996); e, por laparotomia (LOI et al., 1998; ARMSTRONG; EVANS, 1983), sendo esta, a de maior abrangência comercial na espécie ovina, em virtude da praticidade ao acesso uterino e melhores índices de recuperação embrionária. Com a adoção de cuidados de assepsia, rapidez no processo cirúrgico adquiridos com experiência profissional e utilização de solução fisiológica 0,9% com objetivo de tornar sempre úmida a mucosa uterina, é consideravelmente baixa as sequelas advindas deste processo.

Segundo Baldassare (2008), que conceitualmente divide a tecnologia da TE em duas etapas com diferentes graus de sucessos e dificuldades: a primeira envolve a fêmea doadora e a segunda está relacionada a receptora. O sucesso frequentemente obtido com a receptora, não é semelhantemente, tão eficiente com a doadora, o que representa um grande entrave na maior difusão desta biotecnologia.

A colheita dos embriões é programada para ocorrer entre o 6° e o 7° dia após o início do estro por meio de lavagem uterina com solução tampão-fosfato Phosphated Buffered Saline (PBS) (ALMEIDA et al., 2002). As taxas de recuperação de estruturas apresentam variações de acordo com o método de colheita, qualidade do procedimento e prática do técnico. Em geral, recupera-se mais de 50-60% das estruturas. Essa taxa é calculada sobre a resposta ovulatória, indicando-se sua avaliação por ultrassonografia ou por via laparoscópica no dia da colheita dos embriões. Embora a via transcervical apresente vantagens expressivas frente às demais técnicas, sua eficiência (taxa de recuperação de estruturas) é ainda inferior (FONSECA et al., 2011).

Observações diversas são descritas na literatura quanto à taxa de recuperação embrionária na TE por laparotomia. Bari et al., (2001), avaliando seus resultados de TE em um período de oito anos, com um total de 328 ovelhas doadoras, observaram média de 8,6 embriões recuperados por doadora. Mcevoy et al. (1996), obtiveram média de 4,9 embriões recuperados,

semelhante aos achados de Lymberopoulos et al. (2001), com média de 4,9 embriões viáveis de um total de 6,3 estruturas recuperadas.

Rizzo H. et al. (2009), em trabalhos comerciais de TE para formação de rebanho, obtiveram médias de 10,4 estruturas colhidas e, 8,4 embriões transferidos, fazendo uso de uma única IAL com sêmen congelado às 54-56 horas pós-remoção do dispositivo de progesterona.

Após a lavagem uterina, dar-se a pesquisa das estruturas recuperadas no meio de lavagem, sob estereomicroscópio e, a avaliação e classificação morfológica das estruturas encontradas de acordo o Manual da *Sociedade Internacional de Transferência de Embriões* (IETS, 2008). Os embriões viáveis e classificados em graus de I a III, são transferidos para receptoras que apresentam estro sincronizado com a respectiva doadora (ALMEIDA et al., 2008).

A técnica mais utilizada na transferência dos embriões viáveis é a semi-laparoscopia, que permite a avaliação dos ovários por meio da laparoscopia, a exposição de pequena parte do corno uterino ipsilateral ao ovário responsivo ao tratamento de sincronização, ou seja, contendo um corpo lúteo funcional, e a transferência dos embriões propriamente dita (CARNEIRO, et al., 2009). Por meio desta técnica, observam-se taxas de gestação que variam de 40 a 80 % (FONSECA et al., 2010).

A inovulação transcervical não-cirúrgica, é uma tendência futura, a exemplo do que ocorreu em bovinos. Neste caso, o corpo lúteo deve ser localizado por ultra-sonografia para determinação de qual corno receberá o embrião. Todavia, o diâmetro do inovulador, a idade e a ordem de parição poderão conferir maior ou menor facilidade à técnica (FONSECA, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este trabalho objetivou identificar o momento adequado da IAL em ovelhas submetidas a programa comercial de MOTE, buscando-se aumentar o número de embriões recuperados e, a taxa de prenhez.

3.2. Específicos

a) Identificar, com o uso da laparoscopia, o momento das ovulações em ovelhas submetidas a programa comercial de MOTE;

b) Determinar o melhor momento para a deposição do sêmen, refrigerado e criopreservado, em ovelhas submetidas a programa comercial de MOTE;

c) Avaliar a taxa de prenhez de acordo com o status ovariano e manipulação de sêmen.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. M.; PEÑA-ALFARO, C.E. Inseminação artificial em tempo fixo em cabras toggenburg: avaliação de protocolo de sincronização de estro com onze dias de progesterona. In: Congresso Internacional de Caprinos e Ovinos - FEINCO, 5, 2008, São Paulo. **Anais...**. 2008a.

ALMEIDA, V. M.; PEÑA-ALFARO, C.E. Transferência de embriões em cabras savanas: avaliação de três sucessivos programas de superovulação com FSHp. In: Congresso Internacional de Caprinos e Ovinos - FEINCO, 5, 2008, São Paulo. **Anais...**. 2008b.

ALMEIDA, V.M.; CÂMARA, D. R,; SALLES, H. O. Colheita de embriões por via transcervical em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** supl. 5, p. 82-84, 2002.

ALMEIDA, V.M.; et al. Dinâmica ovariana em ovelhas submetidas a um programa de transferência de embriões. In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 5, João Pessoa, **Anais...**2011.

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

BALDASSARE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science.** v. 82-83, p. 255-266. 2004.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275-284, 2002.

BALDASSARRE, H. 2008. Coleta, Conservação e Transferência de Embrião. In: **Aisen, E.G. Reprodução ovina e caprina**. 1ª Ed. São Paulo-SP: MedVet. 143-152.

BARI, F.; KHALID, M.; WOLF, B.; HARESING, W. et al.The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. **Theriogenology**, v. 56, n. 12, p. 147-155, 2001.

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

BICUDO, S.D. (1999). Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular, avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima. Botucatu, **Tese (Livre docência**)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO,H.C.; MAIA S.M.; GREEN, R.E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 35, p. 787-792, 2007.

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v.49, n.15, p.1031-7, 1998.

BRANDÃO, G.S.B. Uso da dinâmica folicular ovariana a avaliação de diferentes tratamentos de sincronização de estro em cabras canidé exploradas no semiárido do Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, UNIVASF, Petrolina, 2010.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em caprinos: protocolos e ferramentas visando uma maximização reprodutiva. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p.50-54, dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br.

COSTA, R.L.D. Aspéctos Reprodutivos das Ovelhas. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 4, n. 1, 2007. Disponível em: www.eptaregional.sp.gov.br. Acesso em: 10 mar 2012.

CUNHA, E. A; BUENO, M.S.; SANTOS, L.E.; RODA, D.S.; OTSUK, I.P. (2001) Desempenho e características de carcaça de cordeiros suffolk alimentados com diferentes volumosos. **Ciência Rural;** Santa Maria, v. 31, n.3, p. 671-676.

D'ALESSANDRO,A.G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1764-1774, 2005.

DAVIS, J.S.; WAY, J.V.; KEEL, B.A. Mechanism of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteus. **Theriogenology**, v.46, p.1351-1380. 1996.

DESHPANDE D, RAVINDRA JP, NARENDRANATH R, NARAYANA K. 1999. Ovarian antral follicular dynamics and serum progesterone concentration during the oestrous cycle of Bannur ewes. **Indian J Anim Sci**, 69:932-934.

DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; MENDES JR, J.O.B.; ESPER, C.R.. Eficiência de dois diferentes produtos hormonais na superovulação de vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, n.3, p. 319-20, 1999.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P. et al. AI in sheep: breed differences in timing of ovulation. **J. Agric. Food Res**., n. 39, p.3, 2000.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and catte. **Theriogenology**, n. 35, p. 55-79, 1991.

DUGGAVATHI, R. BARTLEWSKI, P.M. BARRETT, D.M.W.; RAWLINGS, N. C. The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. **Theriogenology**, article in press, 15 p., 2005.

EVANS A.C.O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, p. 699-715, 2000.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths Pty Limited, Australia, 194p. 1987.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais**: Palestras, 2005.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, **Anais**...: Palestras, 2005.

FONSECA, J.F. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 34 (Supl 1), p. 65-70, 2006.

FONSECA, J.F.; SOUZA J.M.G.; CAMARGO L.S.A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. In: Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 24, Porto de Galinhas, 2010. **Anais**... p. 85-96, 2010.

FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 35, p.113-117, 2011.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVEZ, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 1ª Ed., 179-194, 2002.

GINTHER OJ, KOT K. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, 42:987-1001.

GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICHE PM, GIBBONS JR, KOT K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, 55:1187-1194.

GONZALEZ, C.I.M.; PINHEIRO, A.A.; CUNHA, M.G.G. Avanços na transferência de embriões em caprinos e ovinos de corte no Brasil. In: Simpósio Internacional de caprinos e ovinos de corte, 2, **Anais**, p. 331-359, 2005.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIÁN, A. Effect of follicular development and superovulatory protocol on ovulation rate in ewes. In: I Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Estoril (Portugal), **Anais...**, v.2, p.40-41, 1997.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reprod. Fertil. Dev**., v. 16, p. 447-54, 2004.

GREEN, R.E.; SANTOS, B.F.S.; SICHERLE, C.C. et al. Efeito da adiministração de D-Clopostenol na taxa de ovulação, recuperação e viabilidade embrionária em ovelhas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1223, 2007.

GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, v.25, p.6-9, 2006.

IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3ª edição, Illinois Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M., 180 p., 1998.

ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v.19, n.1, 35-43, 1996.

HARESIGN, W.; BASIOUNI, G.F. e KHALID, M.(1996). Effect of progesterone priming on gonadotropin secretion and luteal function in GnRH-treated seasonally anoestrus ewes. **Animal Science**, v.62, p.97-103.

JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Fertility of superorvulated ewes following intrauterine or oviducal insemination with fresh or frozen-thawed semen. **Reprod. Fertil. Dev.,** n. 3, p. 1-7, 1991.

KARSCH, F. J., MALPAUX, B. WAYNE, N. L.ROBINSON, J. E. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. **Reprod. Nutr. Dev**., v. 28, p.459-472, 1988.

KARSCH, F.J., DAHL, G.E.; EVANS, N.P.; et al. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: Alteration in response to negative feedback action of estradiol. **Biol. Reprod**., v. 49, p. 1377-1383, 1993.

KILLEN, I.D.; CAFFREY, G.J. Uterine insemination of ewes with the AID of laparoscope. **Aust. Vet. J.,** v.59, n. 23, p. 69-73, 1982.

LASSALA, A. et al. The influence of the corpus luteum on ovarian follicular dynamic during estrous synchronization in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 369-375, 2004.

LOBO, R.N.B. Melhoramento genético de caprinos e ovinos: Desafios para o mercado. In: **Seminário Nordestino de Pecuária**, 5, 2002, Fortaleza,CE. Anais do seminário. P.44, 2002.

LOI, P.; PTAK, G.; DATTENA, M.; et al. Embryo transfer and related Technologies in sheep reproduction. **Reproduction Nutrition and Development**., v. 38, p. 615-628, 1998.

LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZÁLES-BULNES, A.; MORENO, J. S. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Compendio de Conferencias. **XXIX Curso Internacional de Reproducción animal**. Madrid. p.43-52, 2006.

LUCIDI,P.; BARBONI,B.; MATTIOLO,M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen seen in sheep. **Theriogenology***,* v. 55, p. 1797-1805, 2001.

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

LYMBEROPOULOS, A.G.; AMIRIDIS, G.S.; KUHHOLZER, B.et al. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1855-1862, 2001.

MAXWELL, V.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. **Animal Reproduction Science**, n.10, p.301-308, 1986

MEDEIROS, A.L.N.; MEDEIROS, C.H.N.; VIEIRA, D.G.I.; MEDEIROS, M.N.; MONTEIRO, A.W.U.; FACÓ, O.; GUSMÃO, A.L. Inseminação laparoscópica a campo em ovelhas mestiças no Sertão Central do Ceará (dados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, n. 5, p. 84-86, 2002.

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

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

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**. v.22, p.113–118, 2010.

MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. ROBERTSON, I.S. The effect of time on intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. **Theriogenology**, v. 46, n. 4, p. 727-738, 1996.

MYLNE, M.J.A.; HUNTON, J.R.; BUCKRELL, B.C. Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Lange Animal. **Theriogenology**, P. 585-597, 1997

NAQVI, S.M.K., JOSHI, A., DAS, G.K., MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**. v.39, p.199-208, 2001.

OLIVEIRA, M.E.F. Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas Santa Inês. **Tese Doutorado**, UNESP, Jaboticabal, 2011b.

OLIVEIRA, M.E.F. Estado da arte da superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 65-70, 2011a.

OLIVEIRA, M.E.F.; Santos, I.C.C.; PIERONI, J.S.P. ; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; NASCIMENTO, P.M.P.; SOUZA, S.F.; FONSECA, J.F.; VICENTE, W.R.R. Superovulatory response and embryo production influenced by the addition of LH and effect of the repeatability in Santa Inês sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21. p.171, 2009.

OLIVEIRA, R.P.M., OLIVEIRA, F.F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. **PUBVET**, v.2, n.7, Fev3, 2008c.

OLIVEIRA, M.E.F.; VICENTE, W.R.R.; COSTA, D.A.C.P.; CORDEIRO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SOUSA S.F., RODRIGUES L.F.S. Effects of LH administration at end of the FSH superovulatory regimen on ovulatory period in Santa Inês sheep. **Hungarian Veterinary Journal**. Budapest, p.129, 2008a.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; PIERONI, J.S.P.; SOUZA, S.F.; SANTOS, I.C.C.; RODRIGUES, L.F.S.; FONSECA J. F.; VICENTE W.R.R. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.598, 2008b.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P.A.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 127-177, 2002.

REYNA J, THOMPSON P, EVANS G, MAXWELL C..Synchronization of ovulation in Merino ewes with GnRH in the breeding and non-breeding season. **Reprod Fertil Devel**, 17:320, 2005.

RIGOLON L.P.; CAVALIERI F.L.B.; SILVEIRA A. **Iniciação Científica** CESUMAR, Maringá, v.1, n. 1, p. 14-19, 1999.

RIZZO,H. et al. Transferência de embriões como ferramenta para formação de rebanho experimental ovino. **Revista Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1, p. 814-820, 2009.

ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CUIBIU, E.P.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.C. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biology of Reproduction**. v.61, p.209-218, 1999.

ROMANO, J.E., RODAS, E., FERRREIRA, A., LAGO, I., BENECH, A. Effects of progestagen, PMSG and artificial insemination time on fertilityu and prolificacy in Corriedale ewes. Small Rumin. Res., v. 23, 157-162; 1996.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: **CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES**, 2000 São Paulo. p. 255-282.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, n.62, p.77-111, 2000.

SIMPLICIO A.A. A Caprino-Ovinocultura na Visão do Agronegócio. Rev. CFMV, v.7, n. 24, p. 15, 2001.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; SANTOS, D.O. Biotécnicas da reprodução em caprinos. **Revista Ciências Agrárias**. Belém. v. 43, p. 1-20. 2005.

TABET, A.F. Transferência intratubária videolaparoscópica de embriões ovinos fertilizados in vitro. **Tese Doutorado**, FMVZ-USP, São Paulo, 2007.

TRALDI A.S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: Congresso Internacional de Caprino e Ovinos - FEINCO, 3, 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo, p. 1-11, 2008.

VIÑOLES, C. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral thesis, Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 56p. 2003.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. **Animal Science**, v. 74, p. 539-545, 2002.

ZAMBRINI, F.N. Dinâmica ovulatória em inseminação artificial em tempo pré-determinado em cabras com estro induzido. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/8/TDE-2006-12-13T142631Z-158/Publico/texto%20completo.pdf. Acesso em: 10 mar, 2013.

Capítulo II

Momento da ovulação em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões

O artigo apresentado nas próximas páginas será submetido à **Revista Ciência Rural**, estando escrito e formatado conforme normas disponíveis em anexo e:

http://www.ufsm.br/ccr/revista/normas.htm

Momento da ovulação em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões

Ovulation time in sheep submitted to multiple ovulation and embryo transfer program

Valdir Morais de Almeida[1*], Carlos Enrique Peña-Alfaro[2], Clarissa Neuman Ramos César[3], Willder Rafael Ximenes Cunha[4], Maria Madalena Pessoa Guerra[5], André Mariano Batista[6], Sildivane Valcácia Silva[7], Gustavo Ferrer Carneiro [8]

RESUMO

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal favorecem o crescimento da pecuária e permitem a melhoria do padrão genético das criações. Entretanto, limitações como o desconhecimento do momento ideal para realização da inseminação diminuem os resultados destas biotécnicas. Objetivou-se com este trabalho, identificar a dinâmica ovariana de fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões. Foram utilizadas dez fêmeas ovinas, multíparas, com idade entre 20 e 50 meses. A sincronização do estro foi realizada com uso de dispositivo vaginal CIDR® (D0) e indução de superovulação por administrações de FSH-p (Folltropin®), em oito doses decrescentes a cada doze horas, iniciando no D12. No D15 foram removidos os dispositivos intravaginais e administradas 200UI de eCG (Novormon®, Intervet). No dia seguinte, administrou-se GnRH (4μg de acetato de buserelina - Conceptal®,

[1*] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE/Recife, PE. e-mail: valdirvet@hotmail.com. Autor para correspondência
[3] Universidade Federal de Campina Grande - CSTR/Patos, PB. Prof. Dr. Adjunto
[3] Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE/Recife, PE
[4] Graduando Medicina Veterinária UAG/UFRPE – Garanhuns-PE
[5] Universidade Federal Rural de Pernambuco -DMV-Recife, PE, Profa. Dra. Adjunta.
[6] Universidade Federal Rural de Pernambuco –Pós-doutorando PNPD.
[7] Universidade Federal da Paraíba -CBiotec, Profa. Dra. Adjunta.
[8] Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) - UFRPE/Garanhuns, PE. Prof. Dr. Adjunto.

Intervet). Após detecção do cio e 24 horas pós-remoção dos CIDR®, as fêmeas ficaram em jejum por 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas pós-remoção dos CIDR® ou até observação das ovulações. Observou-se maior concentração (90%) do momento das ovulações às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal. Cinquenta e duas horas pós-remoção do CIDR® todas as fêmeas do programa haviam ovulado, não sendo necessária a avaliação às 56 horas. Conclui-se que fêmeas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais.

Palavras-chave: laparoscopia, ovulação, ovinos.

ABSTRACT

Biotechnology applied to animal reproduction favor livestock development and allow an improvement in genetics of the herd. However, limitations such as unknowing the ideal time for insemination reduce biotechnologies results. The aim of this work, was identify ovarian dynamic in ewes submitted to multiple ovulation and embryo transfer program. Ten multiparous ewes, aged between 20 to 50 months were used. Estrous synchronization was performed using intravaginal progesterone device (CIDR® - D0) and superovulation induction with FSH-p (Folltropin®), in eight decreasing doses every twelve hours, starting at D12. In D15, intravaginal progesterone device was removed and females were exposed to vasectomized males. After estrous detection and 24 hours post device removal, females were fasted for 12 hours. Ovarian status observation was performed by laparoscopy at 36, 40, 48, 52 and 56 hours post CIDR® removal or until ovulation was seen. A higher concentration of ovulation was identified 48 hours after intravaginal device removal. Fifty-two hours after deviceremoval, all females had ovulated, which did not required the 56 hour evaluation. We

conclude that ewes submitted to multiple ovulation and embryo transfer has a rapid follicular growth and at 48 hours after intravaginal devices removal it was observed a greater concentration of ovulation.

Key words: laparoscopy, ovulation, sheep.

INTRODUÇÃO

A determinação exata do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação artificial (IA), assim, o objetivo em se proporcionar o encontro do espermatozóide com o oócito no momento em que este encontre-se viável, a nível de oviduto, é influenciado, principalmente, pela opção a um determinado método de sincronização, técnica de inseminação e tipo de sêmen (fresco ou criopreservado), conferindo variações nos resultados de fertilidade (MYLNE et al., 1997).

A transferência de embriões (TE), considerada tão importante para a fêmea, quanto a IA é para os machos, apresenta alguns entraves que limitam sua difusão na espécie ovina, como: dificuldades da técnica, custo elevado, eficiência variável e pouco previsível (SIMPLÍCIO et al., 2005; BALDASSARE; KARATZAS, 2004), horário da ocorrência da ovulação após a sincronização do estro (DONOVAN et al., 2000) e, ausência da definição do melhor momento da IA visando a fertilização *in vivo* (ALMEIDA, et al., 2011), o que poderia ser reduzido melhorando-se a sincronia entre as ovulações e os procedimentos de IA em animais superovulados. (MENCHACA et al., 2010).

A partir do conhecimento da dinâmica folicular e, do momento da ovulação, torna-se possível incrementar os resultados da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), ou seja, com tempo pré determinado, alcançando-se, desta forma, o melhor momento da deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, incrementando-se a utilização da IA e TE,

consequentemente, contribuindo para o melhoramento genético, eficiência reprodutiva e produtividade do rebanho nacional (ALMEIDA, et al., 2011).

Quando do emprego de sêmen criopreservado, um dos maiores entraves é a relação entre o tempo de vida útil da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e a ovulação. A determinação do melhor momento para a IA em pequenos ruminantes ainda é uma incógnita devido ao pouco conhecimento sobre a dinâmica ovariana nestas espécies. Todavia, é prudente destacar que a determinação do momento em que ocorre a ovulação em ovelhas submetidas a programas de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE), possibilitará melhor entendimento sobre o tempo ideal para a deposição de sêmen no trato genital da fêmea ovina, estabelecendo-se um protocolo de IATF para animais superovulados (ALMEIDA et al., 2011).

O momento da ovulação em programas de IATF, definido em horas, como o tempo decorrido entre a retirada do dispositivo vaginal de progesterona e a ovulação propriamente dita, sofre variações em decorrência a fatores como estação do ano, idade do animal, estado nutricional e fisiológico, tipo do dispositivo intravaginal, tratamento superovulatório, uso ou não do eCG e GnRH ao final do tratamento superovulatório, entre outros (ROMANO et al., 1996; ALMEIDA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2008a). É importante ressaltar que em protocolos onde é administrado GnRH ao final do tratamento superovulatório, ocorre a modificação do momento ovulatório, informação que deve ser considerada quando do uso da IATF nestes animais (OLIVEIRA et al., 2008a; 2008b). Observação semelhante foi descrita por REYNA et al. (2005), quando administraram GnRH 36 horas após a retirada do progestágeno, antecipando a ovulação em comparação ao grupo controle.

Entretanto o momento recomendado para realizar a IATF é discutível, visto o desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos hormonais disponíveis. Desta feita, o presente

estudo objetivou identificar, com o uso da laparoscopia, o momento das ovulações após o cio sincronizado em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em rebanho comercial, localizado na cidade de Limoeiro (latitude 07º52'29" sul e longitude 35º27'01" oeste, altitude de 138 metros), estado de Pernambuco. Foram utilizadas dez fêmeas ovinas, raça Dorper, sexualmente adultas, pluríparas, com idade entre 20 e 50 meses, não prenhes, não lactantes, com peso médio de 50 ± 5,5 kg, as quais foram identificadas e, consideradas hígidas após serem examinadas por ultrassonografia e exame clinico-ginecológico. Os animais foram segregados e submetidos a um período de adaptação e socialização do grupo por 30 dias, em manejo semi-intensivo, recebendo suplementação concentrada (200g de ração comercial), sal mineral e água *ad libitum*. Quinze dias antes do início da superovulação, buscou-se melhorar o fornecimento do concentrado energético, *flushing* alimentar, promovendo o balanço energético positivo das fêmeas.

A sincronização do estro foi realizada com o uso de dispositivos intravaginais de silicone impregnado com 0,3g de progesterona (CIDR®, Pfizer) e indução da superovulação por administrações sucessivas de Hormônio Folículo Estimulante-FSHp (Foltropin®, Bioniche), em oito doses decrescentes e intervaladas por doze horas (6:00/18:00h), tendo início no dia doze do protocolo, sendo 200mg/doadora, em doses de: 40/40mg; 30/30mg; 20/20mg; 10/10mg. No dia quinze do protocolo, às 6:00h, foram removidos os dispositivos intravaginais e administrado 200UI de eCG (Novormon®, Intervet). Após 24 horas da remoção dos dispositivos intravaginais, administrou-se GnRH (4μg de acetato de buserelina - Conceptal®, Intervet) e, submeteu-se as fêmeas tratadas a presença de um macho

vasectomizado por até 60 horas, ao tempo que foram mantidas em jejum alimentar e hídrico por um período de 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas por laparoscopia, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas após remoção dos dispositivos intravaginais ou até que as ovulações fossem detectadas. Os procedimentos de laparoscopia e o protocolo anestésico foram realizados segundo MEDEIROS et al. (2002).

Os dados obtidos do momento da ovulação tiveram suas distribuições comparadas por índices percentuais sob momento ovulatório (hora) e fenômeno ovariano, sendo: folículos < 5 mm, indicativo de emergência folicular; folículos ≥ 5 mm, indicativos da condição pré-ovulatória; e folículo rompido, indicativo de ovulação, como descrito por SOUZA et al. (1995).

.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais, não foram observados folículos inferiores a 5 mm desde o momento da primeira avaliação laparoscópica, realizada às 36 horas pós-remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, elucidando que fonte exógena de FSH recruta previamente folículos que entrariam em atresia e favorece o rápido crescimento destes (BRAILEANU et al., 1998). Consequentemente, a antecipação da ovulação seria esperada em fêmeas expostas ao tratamento de superovulação em comparação às fêmeas que não receberam estímulo hormonal exógeno.

Questionamentos foram levantados quanto à possível interferência dos procedimentos de laparoscopias seriadas sobre a ovulação. Entretanto, o entendimento de que os procedimentos semi cirúrgicos seriam efetuados, teoricamente, após o pico de LH, seria pouco provável sua interferência na dinâmica ovulatória, como evidenciaram MARTIN et al. (1981) e SOUZA et al. (1995).

O resultado das observações laparoscópicas do status ovariano, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas, apresentados na tabela 1, elucidam uma maior concentração das ovulações entre os momentos de 40 e 52 horas, sendo observado que 70% das ovelhas avaliadas (7/10) ovularam às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal. É prudente destacar que em ovelhas superovuladas, a maior janela de ovulações ocorreu entre as 40 e 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal, reportando-nos a percepção de que é neste espaço de tempo, compreendido pela maior janela de ovulações, que a IA em ovelhas superovuladas deverá ocorrer. Desta feita, inseminações anteriores a 40 horas, com uso de sêmen criopreservado, tende a não alcançar, com a devida eficiência da célula espermática, o oócito a ser fertilizado. Estas observações contradizem os achados de GUSMÃO et al. (2006), quando preconiza a utilização de uma primeira inseminação laparoscópica as 36 horas pós-remoção do dispositivo de progesterona. Entretanto, corroboram com os achados de EVANS e MAXWELL, (1987), quando relatam que em fêmeas superovuladas, o intervalo entre a remoção do progestágeno e a IA intra-uterina por laparoscopia deve ser de 36 a 48 horas, para sêmen fresco, e de 44 a 48 horas para sêmen criopreservado.

Tabela 1 – Momento da ovulação observado por laparoscopias seriadas em ovelhas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões, expresso em percentual de fêmeas.

Status Ovariano	**Laparoscopias seriadas (horas)**			
	36	40	48	52
Folículos < 5mm	-	-	-	-
Folículos ≥ 5mm	90%	80%	10%	-
Ovulações	10%	20%	90%	100%

Alguns estudos preconizam a utilização de mais uma inseminação laparoscópica como forma de melhor alcançar a amplitude da janela de ovulações, principalmente, em animais superovulados, como observam SIMONETTI et al. (2002), GUSMÃO et al. (2006), FONSECA et al. (2005). Entretanto, observou-se neste estudo, que a utilização de um indutor de ovulação, GnRH exógeno (Conceptal®, Intervet), no final do tratamento superestimulatório, pode ter contribuído para uma maior sincronia das ovulações (MENCHACA et al., 2009, 2010; OLIVEIRA et al., 2008), sendo possível preconizar a utilização de apenas uma inseminação laparoscópica, quando do uso do referido protocolo superovulatório.

Observou-se, ainda, que o momento das ovulações em fêmeas superovuladas, nas referidas condições, ocorreu em período anterior quando comparados com os protocolos de sincronização de estro comumente utilizados e observados nos estudos de TAKADA et al. (2003), ao avaliarem o momento ovulatório através de ultrassonografia em ovelhas sincronizadas com MAP + eCG, quando constatou-se que 100% das ovelhas ovularam entre 50 e 67 horas. Em adição, WALKER et al. (1986), encontraram aproximadamente 79% das ovulações ocorrendo às 54 horas pós-remoção do progestágeno e, aproximadamente 20% das ovulações às 66 horas pós-remoção.

Cinquenta e duas horas pós-remoção do progestágeno, todas as fêmeas do programa haviam ovulado, não sendo necessária a avaliação no momento 56 horas. Este fato confirma que a associação entre a sincronização do estro com uso de progestágenos e a superovulação com FSH purificado associado ao GnRH, podem diminuir a janela de ovulações (NASCIMENTO et al., 2009), entendido como a variabilidade ocorrida entre o momento em que o primeiro folículo é rompido até que o último folículo recrutado seja ovulado. Desta feita, observou-se que a dinâmica ovulatória de fêmeas submetidas a um programa de múltipla ovulação apresentou crescimento rápido dos folículos recrutados, com diâmetro

superior a 5mm e ovulação já às 36 h (10 %), com elevada tendência de concentração em um determinado momento do programa, ou seja 48 horas, conferindo dados importantes para a escolha do momento ideal para a monta natural ou realização da IA, bem como, na escolha da técnica de IA e, o tipo de sêmen a ser utilizado, seja refrigerado ou criopreservado.

CONCLUSÃO

Fêmeas submetidas a programa de múltipla ovulação e, sob o referido protocolo, apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais, sugerindo que o momento da IA em ovelhas superovuladas esteja compreendido no entorno deste período/horas e, favorecendo a utilização de uma única IAL, com consequente redução de custos para o produtor e estresse para o animal.

AGRADECIMENTOS

Multiplic - Centro de saúde e reprodução animal & Laboratório de reprodução animal – UAG/UFRPE.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.M.; et al. Dinâmica ovariana em ovelhas submetidas a um programa de transferência de embriões. In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 5, João Pessoa, **Anais...**2011.

BALDASSARE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science.** v. 82-83, p. 255-266. 2004.

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v.49, n.15, p.1031-7, 1998.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P. et al. AI in sheep: breed differences in timing of ovulation. **J. Agric. Food Res**., n. 39, p.3, 2000.

DONROV, T.S.; BATSAIHAN, D.; LEY, W.B. Gonadotrophin extraction from pregnant mare's serum and effect of PMSG preparation on the fertility of Mongolian native ewes. **Small Ruminant Research**, v.28, p.61-66, 1998.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths Pty Limited, Australia, 194p. 1987.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, **Anais**...: Palestras, 2005.

GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, v.25, p.6-9, 2006.

MARTIN,G.B.; OLDHAN,C.M.; LINDSAY,D.R. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. **Theriogenology,** v.6, p.39-44, 1981.

MEDEIROS, A.L.N.; MEDEIROS, C.H.N.; VIEIRA, D.G.I.; MEDEIROS, M.N.; MONTEIRO, A.W.U.; FACÓ, O.; GUSMÃO, A.L. Inseminação laparoscópica a campo em

ovelhas mestiças no Sertão Central do Ceará (dados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, n. 5, p. 84-86, 2002.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**. v.22, p.113–118, 2010.

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.

MYLNE, M.J.A.; HUNTON, J.R.; BUCKRELL, B.C. Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Lange Animal. **Theriogenology**, P. 585-597, 1997.

NASCIMENTO, I.M.R., et al. Sincronização de estro em cabras utilizando diferentes progestágenos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.11, n.1, p.46-54, 2009.

OLIVEIRA, M.E.F.; VICENTE, W.R.R.; COSTA, D.A.C.P.; CORDEIRO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SOUSA S.F., RODRIGUES L.F.S. Effects of LH administration at end of the FSH superovulatory regimen on ovulatory period in Santa Inês sheep. **Hungarian Veterinary Journal**. Budapest, p.129, 2008a.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; PIERONI, J.S.P.; SOUZA, S.F.; SANTOS, I.C.C.; RODRIGUES, L.F.S.; FONSECA J. F.; VICENTE W.R.R. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.598, 2008b.

REYNA J, THOMPSON P, EVANS G, MAXWELL C..Synchronization of ovulation in Merino ewes with GnRH in the breeding and non-breeding season. **Reprod Fertil Devel**, 17:320, 2005.

ROMANO, J.E., RODAS, E., FERRREIRA, A., LAGO, I., BENECH, A. Effects of progestagen, PMSG and artificial insemination time on fertilityu and prolificacy in Corriedale ewes. **Small Rumin. Res**., v. 23, 157-162; 1996.

SIMONETTI, L.; RAMOS, G.; GARDÓN, J.C. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep. **Brazilian Journal Research Animal Science**, v.39, n. 3, p. 143-146, 2002.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; SANTOS, D.O. Biotécnicas da reprodução em caprinos. **Revista Ciências Agrárias**. Belém, v. 43, p. 1-20. 2005.

SOUZA, C.J.H.; CHAGAS, L.M.; MOURA, A.; MORAES, J.C.F. Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e ECG. **Ciência Rural,** Santa Maria, v.25, n.2, p. 277-281, 1995.

TAKADA, L.; BICUDO, S.D.; RODRIGUES, C.F.; LENZ, F. BIANCHINI, D. Avaliação dos momentos do início do estro e da ovulação em ovelhas suffolk submetidas a protocolo de curta duração para a sincronização do estro na préestação reprodutiva. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, p. 475-477, 2003.

WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; SEAMARK, R.F. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment wint FSH ou PMSG with and without GnRH. **J. Reprod. Fertil.,** n. 77, p. 135-142, 1986.

Capítulo III

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas comerciais de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos

O artigo apresentado nas próximas páginas, será submetido à **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, estando escrito e formatado conforme normas disponíveis em anexo e: **http://www.cbra.org.br**

Efeito de diferentes momentos de inseminação artificial laparoscópica em programas comerciais de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos

Effect of different times of laparoscopic artificial insemination in a multiple ovulation and embryo transfer commercial program in sheep

V. M. Almeida[1], C. E. Peña-Alfaro[2], C. N. R. César[3], S.S. Azevedo[4], A. M. Batista[5], M. M. P. Guerra[6], S.V. Silva[7], G. F. Carneiro[8]

[1] Mestrando PGCAT– UFRPE/Recife, PE. e-mail: valdirvet@hotmail.com. Autor para correspondência.

[2] Universidade Federal de Campina Grande - CSTR/Patos, PB.

[3] Mestranda PGCAT – UFRPE/Recife, PE.

[4] Universidade Federal de Campina Grande - CSTR/Patos, PB.

[5] Universidade Federal Rural de Pernambuco –Pós-doutorando PNPD.

[6] Universidade Federal Rural de Pernambuco -DMV- Recife, PE.

[7] Universidade Federal da Paraíba -CBiotec, João Pessoa,PB.

[8] Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) - UFRPE/Garanhuns, PE

RESUMO

Avaliou-se dois momentos da inseminação artificial laparoscópica (IAL) com uso de sêmen resfriado e criopreservado em ovelhas submetidas a programa comercial de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE). Vinte fêmeas foram divididas em quatro tratamentos definidos quanto ao horário da IAL e tipo de sêmen utilizado: T1 – 36 h / resfriado; T2 – 48 h / resfriado; T3 – 36 h / criopreservado e; T4 –

48 h / criopreservado. Cinco dias após IAL, os embriões foram coletados por laparotomia e, as estruturas recuperadas avaliadas e transferidas para receptoras sincronizadas. Não houve diferença no número de estruturas viáveis, do T1 e T2, entretanto, foi observado aumento significativo (P< 0,05) no percentual de prenhez entre os tratamentos, T3 = 9,1 ± 13,3 % e T4 = 49,2 ± 30,1 %, demonstrando que o uso da IAL com sêmen criopreservado, na condição de pré-ovulação (36 h), não foi eficaz na fertilização das estruturas oocitárias. Observou-se ainda que uma única IAL, foi suficiente para produção embrionária, com exceção do T3, alcançando-se melhores índices no T4, com fertilização de 62,5 ± 39,3 %, e confirmação ultrassonográfica de 49,2 ± 30,1 %, das estruturas produzidas, sendo possível a indicação deste procedimento em programas comerciais de MOTE em ovinos.

Palavras-chave: laparoscopia, ovulação, ovinos, transferência de embriões.

ABSTRACT

Two different moments of laparoscopic artificial insemination (LAI) were evaluated in sheep using cooled and frozen semen subjected to multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in a commercial program. Twenty ewes have been divided into four treatments defined as time of the LAI and type of semen used: T1-36 h/cooled; T2-48 h/cooled; T3-36 h/frozen and; T4-48 h/frozen. Five days after LAI, embryos were collected by laparotomy and recovered structures evaluated and transferred to synchronized recipients. No difference was seen in the number of viable structures from T1 and T2, however, a significant increase was observed (P < 0.05) in the percentage of pregnancies between T3 = 9.1 ± 13.3% and T4 = 49.2 ± 30.1%, demonstrating that the use of LAI with frozen semen, in a preovulatory condition (36 h), was not effective in

fertilizing the oocytes. It was observed that a single LAI was sufficient for embryo production, with the exception of T3, reaching better results in T4, with 62.5 ± 39.3% fertility rate, and pregnancy rate of 49.2 ± 30.1% in the recipients, being possible to indicate this procedure to MOET commercial programs in sheep.

Key words: laparoscopy, ovulation, ovine, embryo transfer

INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) apresenta-se como uma biotecnologia da reprodução aplicada a fêmeas com sua importância comparada ao que representa a inseminação artificial (IA) para o macho. Entretanto, alguns entraves limitam sua difusão na espécie ovina, tais como: dificuldades da técnica, custo elevado, eficiência variável e pouco previsível (Baldassare e Karatzas, 2004; Simplício et al., 2005), horário da ocorrência da ovulação após a sincronização do estro (Donovan et al., 2000) e, ausência da definição do melhor momento da IA visando a fertilização *in vivo* (Almeida et al., 2011), o que poderia ser reduzido melhorando-se a sincronia entre as ovulações e os procedimentos da IA em animais superovulados. (Menchaca et al., 2010).

A partir do conhecimento da dinâmica folicular e do momento da ovulação em animais superovulados, torna-se possível incrementar os resultados da inseminação artificial laparoscópica (IAL), em programas de biotecnologias reprodutivas, com elevada contribuição para o melhoramento genético, eficiência reprodutiva e produtividade do rebanho nacional (Almeida, et al.,2011).

Quando do emprego de sêmen criopreservado, um dos maiores entraves é a relação entre o tempo de vida útil da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e

a ovulação. A determinação do melhor momento para a IA em pequenos ruminantes ainda é uma incógnita devido ao pouco conhecimento sobre a dinâmica ovariana nestas espécies. Todavia, faz-se prudente destacar que a determinação do momento em que ocorre a ovulação em ovelhas submetidas a programas de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE), possibilitará melhor entendimento sobre o tempo ideal para a deposição de sêmen no trato genital da fêmea ovina, estabelecendo-se um protocolo de IATF para animais superovulados (Almeida et al., 2011).

Em adição, Evans e Maxweel (1987); Mylne et al., (1997), consideram a determinação exata do momento da ovulação como crucial para o sucesso da IA, visto que o oócito tem uma duração de vida fértil muito curta, 12 a 24 horas. Em assim sendo, o objetivo maior é que o espermatozóide atinja o oviduto no momento em que ali exista um oócito viável. Entretanto, o momento recomendado para realizar a IATF é discutível, em virtude do desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos hormonais disponíveis.

Almeida et al. (2011), estudando o momento da ovulação em ovelhas submetidas a programa de MOTE, apontam que ovelhas superovuladas, apresentam maior concentração das ovulações entre 40 e 52 horas, indicando que o momento da IAL nestes animais seja compreendido em torno deste período.

Alguns estudos preconizam a utilização de mais de uma IAL como forma de se melhor alcançar a amplitude da janela de ovulações, principalmente, em animais superovulados, como observam Simonetti et al. (2002), Fonseca et al. (2005), Gusmão et al. (2006). Entretanto, com a utilização de um indutor de ovulação, GnRH exógeno (Conceptal®, Intervet), no final do tratamento superovulatório, tende a contribuir para uma maior sincronia das ovulações (Oliveira et al., 2008; Menchaca et al.,2009,2010).

Desta forma, sendo possível preconizar a utilização de apenas uma IAL, quando do uso do referido protocolo superovulatório, tornando-se assim, um procedimento prático e economicamente viável (Almeida et al. 2011).

Ademais e, com base nas informações adquiridas nos estudos de dinâmica ovulatória em animais superovulados, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia de dois momentos de IAL, para uso de sêmen resfriado e criopreservado em ovelhas submetidas a programa comercial de MOTE.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em rebanho comercial, localizado na cidade de Limoeiro (latitude 07º52'29" sul e longitude 35º27'01" oeste, altitude de 138 metros), estado de Pernambuco. Foram utilizadas vinte fêmeas ovinas, raça Dorper, denominadas de doadoras de embriões, sexualmente adultas, pluríparas, com idade entre 20 e 50 meses, não prenhes, não lactantes, com peso médio de 50 ± 5,5 kg, as quais foram identificadas e, consideradas hígidas após exame clinico-ginecológico por ultrassonografia. Os animais foram separados e submetidos a um período de adaptação e socialização do grupo por 30 dias, em manejo semi-intensivo, recebendo suplementação concentrada (200g de ração comercial), sal mineral e água *ad libitum*. Aos 15 dias do início da superovulação, buscou-se melhorar o fornecimento do concentrado energético, *flushing* alimentar, promovendo o balanço energético positivo das fêmeas.

A sincronização do estro foi realizada com o uso de dispositivos intravaginais de silicone impregnado com 0,3g de progesterona (CIDR®, Pfizer) e indução da superovulação por administrações sucessivas de Hormônio Folículo Estimulante-FSHp (Foltropin®, Bioniche), em oito doses decrescentes e intervaladas por doze horas (6:00/18:00h), tendo início no dia doze do protocolo, sendo 200mg/doadora, em doses

de: 40/40mg; 30/30mg; 20/20mg; 10/10mg. No dia quinze do protocolo, às 6:00h, foram removidos os dispositivos intravaginais e administrado 200UI de eCG (Novormon®, Intervet). Após 24 horas da remoção dos dispositivos intravaginais, administrou-se GnRH (4µg de acetato de buserelina - Conceptal®, Intervet) e, as fêmeas tratadas foram submetidas a presença de um macho vasectomizado por até 60 horas.

Vinte e quatro horas da remoção dos dispositivos intravaginais, as fêmeas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico por um período de 12 horas e, divididas em quatro tratamentos, os quais foram definidos com base nos achados de Almeida et al. (2011), quanto ao horário da IAL com base na remoção do dispositivo intravaginal e quanto ao tipo de sêmen utilizados, a saber: T1 – IAL às 36 h, indicativo da condição de pré-ovulação, com sêmen resfriado; T2 – IAL às 48 h, indicativo da condição de pós-ovulação, com sêmen resfriado; T3 – IAL às 36 h, indicativo da condição de pré-ovulação, com sêmen criopreservado; T4 – IAL às 48 h, indicativo da condição de pós-ovulação, com sêmen criopreservado.

O sêmen resfriado e criopreservado utilizado no referido estudo foram provenientes de reprodutores de alta qualidade genética e, adquirido de Central idônea, registrada no Ministério da Agricultura e, processado segundo Bicudo et al. (2005).

As inseminações laparoscópicas e o protocolo anestésico foram realizadas como descrito por Medeiros et al. (2002) e, passados cinco dias deste procedimento, foram realizadas as colheitas de embriões por meio da técnica de laparotomia como descrito por Armstrong e Evans (1983). As estruturas recuperadas nas colheitas foram avaliadas e classificadas morfologicamente, sob estereomicroscópio, seguindo-se as normas técnicas preconizadas pela IETS (2008), *International Embriyo Transfer*

Society. Os embriões viáveis e classificados em graus de I a III, foram transferidos, de imediato, para receptoras que apresentaram estro sincronizado com as doadoras.

Concomitante a separação do grupo das doadoras de embriões, foi separado um grupo de receptoras, sendo estas em número de cinco por doadora, as quais foram avaliadas por critérios idênticos ao grupo das doadoras e, apesar de terem sido mantidas em piquete separado, receberam manejo e dieta alimentar idêntico a estas. Quando do início do protocolo hormonal do grupo das doadoras, deu-se também início a sincronização do estro das receptoras, recebendo para tanto, dispositivo vaginal impregnado com 60 mg de medroxiprogeterona – MAP (Progespon®), por um período de 15 dias, quando se deu a sua retirada e aplicação de 400UI de gonadrotofina coriônica eqüina – eCG (Folligon®) por via intramuscular. A detecção do estro foi realizada duas vezes ao dia, com auxílio de um macho vasectomizado da mesma espécie.

A transferência dos embriões colhidos foi realizada pela técnica de semi-laparoscopia, segundo Carneiro et al. (2009), no mesmo dia da colheita, sendo estes transferidos a fresco. As receptoras foram mantidas sob o mesmo manejo e, avaliadas quanto ao estado gestacional por meio de ultrassonografia aos 35 dias da transferência, pela via transabdominal com a parelho Aloka SSD 500 (Aloka Co., Ltda., Tokio, Japan) equipado com transdutor convexo de 3,5MHz.

Para a comparação dos tratamentos em relação às variáveis de número total de estruturas colhidas, % de estruturas não fertilizadas, % de estruturas degeneradas, % de estruturas viáveis (embriões) e, % de embriões confirmados pela ultrassonografia, inicialmente foi realizado um teste de normalidade para a verificação da distribuição dos dados. Para variáveis com distribuição normal foi utilizada a análise de variância

(ANOVA) com um critério de classificação e comparações múltiplas com o teste de Tukey; para variáveis sem distribuição normal foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste de Nemenyi (Zar, 1999). O nível de significância adotado foi de 5%.

. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as doadoras responderam ao tratamento hormonal e, não houve diferença significativa ($P<0,05$) no número total de estruturas colhidas entre os tratamentos, demonstrando uma boa resposta ao protocolo hormonal empregado, com resultado médio de recuperação de estruturas de 11,15 ± 6,35, ressaltando, também, a eficiência do procedimento de lavagem uterina e, resposta ovulatória satisfatória. Este resultado se assemelha aos encontrados por outros autores como observa-se nas avaliações de protocolos hormonais de superovulação realizadas por D´Alessandro et al. (2005), onde obtiveram média de 11,4 estruturas colhidas em seu melhor grupo e, superior aos encontrados por Lymberopoulos et al. (2001), com média de 6,3 estruturas recuperadas.

Os resultados quanto ao número de estruturas viáveis a serem transferidas, nos tratamentos com IATF com sêmen resfriado (T1 e T2), não variou significativamente apesar do T2 (8,4 ± 5,5) terem apresentado média numericamente superior ao T1 (5,0 ± 3,1), como observado na tab. 1. Médias semelhantes às encontradas por Bari et al. (2001), de 8,6 embriões por doadora e, Mcevoy et al. (1996), que obtiveram média de 4,9 embriões por doadoras.

Observou-se que o uso de uma única IAL com sêmen resfriado, apresentou excelentes taxas de fertilização em animais superovulados, nos diferentes tempos e, mesmo com diferença de 11 ± 3,2 horas no momento da IA entre os tratamentos, demonstrando que após a IA, o sêmen manteve-se viável e foi capaz de superar uma

série de barreiras físicas, passar o oviduto, pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o oócito (Sartori, 2004). Soma-se a isto, o conhecimento de que a viabilidade espermática do sêmen resfriado é superior ao criopreservado, principalmente em virtude dos danos causados pela técnica de criopreservação, como demonstrado por Bicudo et al. (2007). Esta superior viabilidade do sêmen resfriado foi então entendida como capaz de possibilitar uma maior vida útil da célula espermática e, fertilização das estruturas oocitárias mesmo após 11 ± 3,2 horas da realização da IAL, como observado no presente estudo. Achados semelhantes foram alcançados por Evans e Maxwell, (1987), com sêmen fresco, em uma única IAL realizada no intervalo compreendido entre 36 a 48 horas.

A confirmação dos resultados, por ultrassonografia, referente ao número de prenhezes produzidas a partir do total de estruturas colhidas, não demonstraram diferença significativa nos resultados entre os tratamentos T1 (31,9 ± 18,0 %) e T2 (41,5 ± 19,7 %), demonstrando uma relativa semelhança na qualidade dos embriões produzidos em ambos os tratamentos quando do uso de sêmen resfriado. Os resultados apresentaram-se com médias abaixo dos encontrados por Green et al. (2007), que transferindo embriões a fresco, obtiveram taxa de prenhez de 50%.

A análise dos dados referentes ao uso de sêmen criopreservado, revelou-nos importantes achados que são determinantes na aplicação desta biotecnologia. Observou-se que o percentual de estruturas viáveis, fertilizadas com sêmen criopreservado quando do uso da IAL, nas condições de pré-ovulação no T3 e pós-ovulação no T4, demonstrou um discreto aumento numérico para o T4 (8,4 ± 7,3), embora não tenha sido significativamente diferente ($P<0,05$) do T3 (4,0 ± 4,4). Entretanto, um aumento significativo ($P<0,05$), foi observado quanto ao percentual de confirmações de

prenhezes por ultrassonografia ao comparar-se os dois tratamentos, T3 = 9,1 ± 13,3 % / T4 = 49,2 ± 30,1 % do total de estruturas colhidas, demonstrando que o uso da IAL com sêmen criopreservado, na condição de pré-ovulação (36 h), não foi eficaz na fertilização das estruturas oócitarias e, consequentemente, obteve-se um baixo percentual de prenhezes. Fato este, evidenciado pela baixa capacidade da célula espermática permanecer viável por amplo período de antecedência ao momento da ovulação, neste caso, cerca de 11 ± 3,2 horas como descrito por Almeida et al. (2011). Estes achados corroboram Baril et al. (1995), que observa a curta duração da sobrevivência espermática após a descongelação, associado à imprecisão do momento da ovulação como fatores limitantes para o êxito da produção de embriões utilizando sêmen congelado.

É prudente destacar que a utilização de apenas uma IAL, no T4 (IAL – 48 h / sêmen criopreservado), ou seja, no momento pós-ovulação, foi suficiente para fertilizar 62,5 ± 39,3 %, e alcançar índice de 49,2 ± 30,1% de confirmações ultrassonográficas do total das estruturas oócitarias produzidas, corroborando os achados de Almeida et al. (2011), onde em seus estudos de dinâmica ovariana em ovelhas submetidas a programa de MOTE, sugeriu que uma única IAL, fosse realizada no entorno das 48 h pós-remoção do dispositivo intravaginal.

A utilização de um único protocolo hormonal em todos os tratamentos, onde se contempla a utilização de um indutor da ovulação no D-16, ou seja, 4µg de acetato de buserelina (Conceptal®, Intervet), bem como, a uniformidade dos resultados entre os tratamentos, com exceção do T3, confirma que a associação entre a sincronização do estro com uso de progestágenos e a superovulação com FSH purificado associado ao GnRH, podem reduzir a amplitude da janela de ovulações (Nascimento et al., 2009),

entendido como a variabilidade ocorrida entre o momento em que o primeiro folículo é rompido até que o último folículo recrutado seja ovulado. Ademais, Almeida et al. (2011), demonstraram uma elevada tendência na concentração das ovulações as 48 h, em ovelhas submetidas a protocolo de superovulação idêntico ao proposto no presente estudo, vindo a corroborar a eficácia de uma única IAL as 48 h pós-remoção do dispositivo intravaginal do presente estudo.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados no presente estudo e, com a utilização do protocolo proposto, é possível indicar a utilização de uma única IAL em programas comerciais de MOTE em ovinos, no entorno das 48 horas pós-remoção do dispositivo intravaginal, com uso sêmen resfriado e, criopreservado, com considerável ganho tecnológico e econômico.

AGRADECIMENTOS

Multiplic - Centro de saúde e reprodução animal & Laboratório de reprodução animal – UAG/UFRPE.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.M. et al. Dinâmica ovariana em ovelhas submetidas a um programa de transferência de embriões. In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 5, 2011, João Pessoa, Anais...João Pessoa, Resumo.

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

.**BALDASSARE, H.; KARATZAS, C.N**. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) im goats. Animal Reproduction Science. v. 82-83, p. 255-266. 2004.

BARI, F.; KHALID, M.; WOLF, B.; HARESING, W. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep.. Theriogenology, v. 56, n. 12, p. 147-155, 2001

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. Manual de Formación Práctica para el Transplante de Embriones em Ovejas y Cabras. Roma. FAO, 1995. 175p.

BICUDO S.D.; AZEVEDO H.C.; SILVA MAIA M.S.; SOUSA D.B.; RODELLO L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. Acta Scientiae Veterinariae. 33 Supl 1, p. 127-130, 2005.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO,H.C.; MAIA S.M.; GREEN, R.E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. Acta Scientiae Veterinariae, v. 35, p. 787-792, 2007.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em caprinos: protocolos e ferramentas visando uma maximização reprodutiva. Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6, p.50-54, dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br

D'ALESSANDRO,A.G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. Theriogenology, v. 63, n. 6, p. 1764-1774, 2005.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P. et al. AI in sheep: breed differences in timing of ovulation. J. Agric. Food Res., n. 39, p.3, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths Pty Limited, Australia, 194p. 1987.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, Anais...: Palestras, 2005.

GREEN, R.E.; SANTOS, B.F.S.; SICHERLE, C.C. et al. Efeito da adiministração de D-Clopostenol na taxa de ovulação, recuperação e viabilidade embrionária em ovelhas superovuladas. Acta Scientiae Veterinariae, v. 35, p. 1223, 2007.

GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. O Embrião, v.25, p.6- 9, 2006.

LYMBEROPOULOS, A.G.; AMIRIDIS, G.S.; KUHHOLZER, B.et al. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. Theriogenology, v. 55, n. 9, p. 1855-1862, 2001.

MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. ROBERTSON, I.S. The effect of time on intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. Theriogenology, v. 46, n. 4, p. 727-738, 1996.

MEDEIROS, A.L.N.; MEDEIROS, C.H.N.; VIEIRA, D.G.I.; MEDEIROS, M.N.; MONTEIRO, A.W.U.; FACÓ, O.; GUSMÃO, A.L. Inseminação laparoscópica a campo em ovelhas mestiças no Sertão Central do Ceará (dados preliminares). Revista Brasileira de Reprodução Animal, Suplemento, n. 5, p. 84-86, 2002.

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.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. Reproduction Fertility and Development. v.22, p.113–118, 2010.

MYLNE, M.J.A.; HUNTON, J.R.; BUCKRELL, B.C. Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Lange Animal. Theriogenology, P. 585-597, 1997.

NASCIMENTO, I.M.R., et al. Sincronização de estro em cabras utilizando diferentes progestágenos. Revista Científica de Produção Animal, v.11, n.1, p.46-54, 2009.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; CORDEIRO, M.F.; PIERONI, J.S.P.; SOUZA, S.F.; SANTOS, I.C.C.; RODRIGUES, L.F.S.; FONSECA J. F.; VICENTE W.R.R. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. Acta Scientiae Veterinariae. v.36, p.598, 2008.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. Acta Scientiae Veterinariae, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 35-50, 2004.

SIMONETTI, L.; RAMOS, G.; GARDÓN, J.C. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep. Brazilian Journal Research Animal Science, v.39, n. 3, p. 143-146, 2002.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; SANTOS, D.O. Biotécnicas da reprodução em caprinos. Revista Ciências Agrárias. Belém. v. 43, p. 1-20. 2005.

ZAR, J.H. (Ed.). Biostatistical analysis. 4ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 662p.

ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Índice de produção de estruturas embrionárias totais, não fertilizadas, degeneradas, viáveis (embriões) e, confirmadas por ultrassonografia, colhidas pela técnica de laparotomia em ovelhas submetidas a programa comercial de múltipla ovulação e transferência de embriões.

Tratamentos	Estruturas colhidas em TE									
	Total	Não fertilizados		Degenerados		Viáveis (embriões)		% de Confirmados	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°
T 1	7,6 ± 2,8 [a]	24,9 ± 31,7 [a,b]	1,4 ±1,5	13,6 ± 13,2 [a]	1,2 ± 1,3	61,5 ±26,1 [a,b]	5 ± 3,1	31,9±18,0 [a,b,c]	2,6 ±1,7
T 2	9,8 ± 5,1 [a]	9,8 ± 15,8 [a]	1,0 ± 1,7	3,6 ± 8,1[a]	0,4 ± 0,9	86,6 ± 23,6 [a]	8,4± 5,5	41,5 ± 19,7 [a,c]	4,2 ±3,3
T 3	14,8 ±10,0 [a]	68,1 ± 23,0 [b]	9,6 ± 6,8	11,8 ± 12,1 [a]	1,2 ± 1,3	20,1 ± 19,0 [b]	4,0 ±4,4	9,1 ± 13,3 [b]	2,0 ±2,7
T 4	12,4 ± 4,6 [a]	30,0 ± 44,7 [a,b]	3,2 ± 4,9	7,5 ± 10,3 [a]	0,8 ± 0,8	62,5 ±39,3 [a,b]	8,4± 7,3	49,2 ± 30,1 [a]	5,0 ±4,5

Na mesma coluna, letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados no presente estudo foi possível concluir que:

- Fêmeas submetidas a programa de múltipla ovulação e transferência de embriões apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais;
- É possível indicar a utilização de uma única IAL em programas comerciais de MOTE em ovinos, no entorno das 48 horas pós-remoção do dispositivo intravaginal, com uso sêmen resfriado e, criopreservado, com considerável ganho tecnológico e econômico. A utilização de uma única IAL no entorno das 48 horas pós-remoção do dispositivo intravaginal, com uso sêmen resfriado e, criopreservado, possibilitou alcançar taxas de prenhezes equivalentes ás alcançadas em programas comercias que fazem uso de duas IAL.

APÊNDICES

(Produção do autor durante o período do mestrado)

Dinâmica ovariana em ovelhas submetidas a um Programa de Transferência de Embriões[1]

Valdir Morais de Almeida[2], Sildivane Valcácia Silva[3], André Mariano Batista[4], Carlos Enrique Peña Alfaro[5], Willder Rafael Ximenes Cunha[6], Maria Madalena Pessoa Guerra[7]

[1]Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de PE
[2]Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE/Recife, PE. e-mail: valdirvet@hotmail.com
[3]Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Pós-doutoranda PNPD.
[4]Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Doutorando do programa RENORBIO
[5]Universidade Federal de Campina Grande - UFCG/Patos, PB. Prof. Dr. Adjunto
[6]Graduando em Zootecnia – UFRPE/Recife,PE.
[7]Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Profa. Dra. Adjunta.

Resumo: As biotecnologias aplicadas à reprodução animal favorecem o crescimento da pecuária e permitem a melhoria do padrão genéticos das criações. Entretanto, limitações como desconhecer o momento ideal para realização da inseminação diminuem os resultados destas biotécnicas. Objetivou-se identificar a dinâmica ovariana de fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões. Foram utilizadas dez fêmeas ovinas, multíparas, com idade entre 20 e 50 meses. A sincronização do estro foi realizada com uso de CIDR® (D0) e indução da superovulação por administrações de Folltropin, em oito doses decrescentes a cada doze horas, iniciando no D12. No D15, removeu-se o CIDR® realizou-se rufiação. Após detecção do cio e 24 horas pós-remoção dos CIDR®, as fêmeas ficaram em jejum por 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas pós-remoção dos CIDR® ou até observação das ovulações. Observou-se maior concentração do momento das ovulações às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal. Cinquenta e duas horas pós-remoção do CIDR® todas as fêmeas do programa haviam ovulado, não sendo necessária a avaliação às 56 horas. Conclui-se que fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais.
Palavras–chave: laparoscopia, ovulação, recrutamento folicular

Ovarian Dynamics in Ewes Submitted to Multiple Ovulation and Embryo Transfer

Abstract: Biotechnology applied to animal reproduction favor livestock growth and improvement genetics standard. However, limitations such as unknowing the ideal time for insemination perform diminish biotechnologies results. The aim was identify ovarian dynamic in ewes submitted to multiple ovulation and embryo transfer. We used ten ewes, multiparous, aged between 20 to 50 months. Estrous synchronization was performed using CIDR® (D0) and superovulation induction with Folltropin®, in eight decreasing doses every twelve hours, starting at D12. In D15, CIDR® was removed and females were exposed to vasectomized male. After estrous detection and 24 hours post CIDR® removal, females were fasted for 12 hours. Ovarian status observation was performed to laparoscopy via at 36, 40, 48, 52 and 56 hours post CIDR® removal. Higher concentration of ovulation was identified 48 hours after intravaginal device removal. Fifty-two hours after CIDR® removal, all females had ovulated, no requires 56 hours evaluation. We conclude that ewes submitted to multiple ovulation and embryo transfer has fast follicular growth and ovulation in higher concentration at 48 hours after intravaginal devices removal.
Keywords: laparoscopy, follicular recruitment, ovulation

Introdução

A transferência de embriões (TE), considerada tão importante para a fêmea quanto a inseminação artificial (IA) para os machos, apresenta alguns entraves que limitam sua difusão na espécie ovina, como: dificuldades da técnica, custo elevado, eficiência variável e pouco previsível (Fonseca et al., 2010) e definição do melhor momento da inseminação artificial visando a fertilização *in vivo*. A partir do conhecimento da dinâmica folicular e, do momento da ovulação, torna-se possível melhorar os resultados

da IATF, ou seja, com tempo pré-determinado, alcançando-se, desta forma, o melhor momento da deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea. Em adição, a utilização de sêmen criopreservado apresenta baixos índices de prenhez quando comparados aos resultados obtidos nos programas que utilizam a monta natural. Desta forma, objetivou-se com este trabalho identificar a dinâmica ovariana de fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido em rebanho comercial, localizado na cidade de Limoeiro (latitude 07º52'29" sul e longitude 35º27'01" oeste, altitude de 138 metros), estado de Pernambuco. Foram utilizadas dez fêmeas ovinas, multíparas, com idade entre 20 e 50 meses. A sincronização do estro foi realizada com o uso de dispositivos intravaginais de silicone impregnado com 0,3g de progesterona (CIDR®, Pfizer) e indução da superovulação por administrações sucessivas de Hormônio Folículo Estimulante-FSH (Foltropin®, Calier), em oito doses decrescentes e intervaladas por doze horas, tendo início no dia doze do protocolo. No dia quinze do protocolo foram removidos os dispositivos intravaginais e as fêmeas foram colocadas na presença de um macho vasectomizado por até 60 horas. Após detecção do cio e às 24 horas da remoção dos dispositivos intravaginais, as fêmeas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico por um período de 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas após remoção dos dispositivos intravaginais ou até que as ovulações fossem detectadas. Os parâmetros utilizados para determinar a dinâmica ovariana foram: folículos< 5 mm; folículos≥ 5 mm, indicativos da condição pré-ovulatória; e folículo rompido, indicativo de ovulação.

Resultados e Discussão

O resultado da dinâmica ovariana nos momentos 36, 40, 48, 52 e 56 horas está apresentado na Tabela 1. Não foram identificados folículos inferiores a 5 mm desde o momento da primeira avaliação laparoscópica às 36 horas pós-remoção do CIDR®. Este resultado elucida que fonte exógena de FSH recruta previamente folículos que entrariam em atresia e favorece o rápido crescimento destes (Braileanu et al., 1998). Consequentemente, a antecipação da ovulação seria esperada em fêmeas expostas ao tratamento de superovulação em comparação às fêmeas que não receberam estímulo hormonal exógeno.

Tabela 1 – Dinâmica ovariana observada por laparoscopias seriadas em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização do estro e superovulação, expresso em porcentagem de fêmeas

Status Ovariano	**Laparoscopias seriadas (horas)**			
	36	40	48	52
Folículos < 5mm	-	-	-	-
Folículos ≥ 5mm	90%	80%	10%	-
Ovulações	10%	20%	90%	100%

Observou-se maior concentração do momento das ovulações entre 40 e 52 horas, sendo que 70% das ovelhas (7/10) ovularam às 48 horas pós-retirada do dispositivo intravaginal, demonstrando que a inseminação artificial em ovelhas superovuladas deverá ocorrer por volta das 40 e 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal. Observa-se, ainda, que o momento das ovulações em fêmeas superovuladas, nas referidas condições, ocorreram em período anterior quando comparados com os protocolos de sincronização de estro comumente utilizados. Devido à purificação e tempo de vida curto do Hormônio Folículo Estimulante-FSH, utilizado neste experimento e, nas referidas condições, os níveis plasmáticos deste hormônio podem ter reduzido drasticamente, o que estimulou o pico de LH endógeno e favoreceu a ovulação. Entretanto, os tratamentos hormonais comumente utilizados na sincronização do estro, não garantem tais resultados, visto que na utilização da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG - atividade biológica tanto do FSH quanto do LH) em outros experimentos, pode estimular o crescimento exacerbado

de folículos sem estimular o pico de LH, visto o eCG conter função luteinizante, porém com menor potencial do que uma descarga endógena (Donrov et al., 1998).

Cinquenta e duas horas após a remoção do CIDR todas as fêmeas do programa haviam ovulado não sendo necessária a avaliação no momento 56 horas. Este fato confirma que a associação entre a sincronização do estro com uso de progestágenos e a superovulação com FSH purificado pode diminuir a janela de ovulação (Nascimento et al., 2009), que é a variabilidade no momento em que o primeiro folículo é rompido até que o último folículo recrutado seja ovulado. Assim, observa-se que a dinâmica ovariana de fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões apresenta crescimento rápido dos folículos recrutados, com diâmetro superior a 5 mm e ovulação já às 36 horas e que tendem a se concentrar em um determinado momento do programa, conferindo dados importantes para a escolha do momento ideal para a monta natural ou realização da inseminação artificial, assim como, na escolha da IA, determinar o tipo de sêmen a ser utilizado, seja refrigerado ou congelado.

Conclusões

Fêmeas submetidas a um programa de transferência de embriões apresentam rápido crescimento folicular e maior concentração de ovulação às 48 horas pós-remoção dos dispositivos intravaginais, sugerindo que o momento da inseminação artificial em ovelhas superovuladas esteja compreendido no entorno deste período/horas.

Agradecimentos

Multiplic - Centro de saúde e reprodução animal / Androlab-UFRPE / Facepe.

Literatura citada

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v.49, n.15, p.1031-7, 1998.

DONROV, T.S.; BATSAIHAN, D.; LEY, W.B. Gonadotrophin extraction from pregnant mare's serum and effect of PMSG preparation on the fertility of Mongolian native ewes. **Small Ruminant Research**, v.28, p.61-66, 1998.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; ALMEIDA, L.S.; Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 24, Porto de Galinhas, 2010. **Anais...** p. 85, 2010.

NASCIMENTO, I.M.R.; SOUSA JÚNIOR, A.; CHAVES, R.M.; VIEIRA, R.J.; COSTA, A.P.R.; MORAES JÚNIOR, F.J.; CORREIA, H.S.; SOUZA, J.A.T. Sincronização de estro em cabras utilizando diferentes progestágenos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.11, n.1, p.46-54, 2009.

Momento da ovulação em ovelhas submetidas a um protocolo de sincronização do estro em Programa de Inseminação Artificial Laparoscópica[1]

Valdir Morais de Almeida[2], Sildivane Valcácia Silva[3], André Mariano Batista[4], Gustavo Ferrer Carneiro[5], Carlos Enrique Peña Alfaro[6], Maria Madalena Pessoa Guerra[7]

[1]Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de PE
[2]Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE/Recife, PE. e-mail: valdirvet@hotmail.com
[3]Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Pós-doutoranda PNPD.
[4]Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Doutorando do programa RENORBIO
[5]Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) - UFRPE/Garanhuns, PE. Prof. Dr. Adjunto
[6]Universidade Federal de Campina Grande - UFCG/Patos, PB. Prof. Dr. Adjunto
[7] Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE/Recife, PE. Profa. Dra. Adjunta.

Resumo: A determinação do melhor momento para a inseminação artificial em pequenos ruminantes ainda é uma incógnita devido ao pouco conhecimento sobre a dinâmica ovariana nestas espécies. Foram utilizadas vinte fêmeas ovinas, multíparas, com idade entre 20 e 50 meses. A sincronização do estro foi realizada com o uso de dispositivos intravaginais por 12 dias e 400UI de gonadotrofina coriônica equina, aplicada no momento da remoção da esponja, quando receberam macho vasectomizado por até 60 horas. Após detecção do cio e às 36 horas da remoção das esponjas, as fêmeas foram submetidas a jejum de 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 48, 52, 56, 60, 64, 68 horas após remoção das esponjas ou até que a ovulação fosse detectada. Os parâmetros utilizados para determinar a dinâmica ovariana foram: folículo< 5 mm; folículo≥ 5 mm, indicativos da condição pré-ovulatória; e folículo rompido, indicativo de ovulação. Foi observada maior concentração do momento da ovulação entre 64 e 68 horas pós-retirada do dispositivo vaginal. A ovulação de fêmeas submetidas a um protocolo de sincronização do estro e programa de inseminação artificial ocorre entre 64 e 68 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais. Desta feita, o momento da inseminação artificial estará na dependência do tipo de sêmen a ser utilizado, se congelado, deve ser utilizado entre 60 e 68 horas após a remoção do progestágeno.
Palavras–chave: dinâmica, laparoscopia, ovário

Ovulation time in sheep submitted to estrous synchronization protocol and artificial insemination program

Abstract: Determining the best time for artificial insemination in small ruminants is still unknown due to little knowledge of the ovarian dynamics in these species. We used twenty ewes, multiparous, aged between 20 and 50 months. Estrous synchronization was performed with the use of intravaginal devices for 12 days and 400 IU of eCG, applied at the time of sponge withdrawal, when stayed with vasectomized males for 60 hours. After estrous detection and 36 hours after removed sponges, female were fasted for 12 hours. The ovarian status of the observations were carried out via laparoscopy, at times 48, 52, 56, 60, 64, 68 hours after removal of sponges or until ovulation detection. The parameters used to determine the ovarian dynamics were: follicle <5 mm and follicles ≥ 5 mm, preovulatory conditions, and ruptured follicle, indicative of ovulation. Ovulation concentration was higher between 64 and 68 hours post-removal vaginal device. Female ovulation subjected to estrous synchronization protocol and artificial insemination program is between 64 and 68 hours after vaginal device removal. Insemination artificial time depends on the used semen type, if frozen, must be used between 60 and 68 hours after vaginal device removal.
Keywords: dynamics, laparoscopy, ovary

Introdução

Para o nordeste brasileiro, a criação de pequenos ruminantes é de grande importância por ser uma prática de manejo fácil e barata, menor ocupação territorial e rápida obtenção de carne pelo abate,

em comparação à bovinocultura. Para a expansão do número de animais, a inseminação artificial tem sido a biotécnica mais comumente utilizada na reprodução, por não precisar manter diversos reprodutores nas propriedades e ainda promover a variabilidade genética nos rebanhos. Entretanto, a utilização de sêmen criopreservado apresenta baixos índices de prenhez quando comparados aos resultados obtidos nos programas que utilizam a monta natural.

Um dos grandes entraves no emprego do sêmen criopreservado é a relação entre o tempo de vida útil da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e a ovulação. A determinação do melhor momento para a inseminação artificial em pequenos ruminantes ainda é uma incógnita devido ao pouco conhecimento sobre a dinâmica ovariana nestas espécies. Sabe-se que, em ovelhas, uma onda de crescimento folicular pode ser definida como um ou mais folículos, que emergem de um conjunto de pequenos folículos antrais e crescem até atingir um diâmetro maior ou igual a cinco milímetros, prosseguindo para a atresia ou ovulação (Duggavathi et al., 2003). Todavia, em animais expostos a um controle hormonal, há a necessidade de determinar o momento em que ocorre a ovulação na espécie ovina e consequentemente qual seria o tempo ideal para executar a deposição de sêmen no trato genital da fêmea, com o intuito de estabelecer um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, como acontece na espécie bovina. Desta forma, objetivou-se com este trabalho determinar o momento da ovulação em ovelhas submetidas a um protocolo de sincronização do estro e programa de inseminação artificial.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido em rebanho comercial, localizado na cidade de Limoeiro (latitude 07º52'29" sul e longitude 35º27'01" oeste, altitude de 138 metros), estado de Pernambuco. Foram utilizadas vinte fêmeas ovinas, multíparas, com idade entre 20 e 50 meses. A sincronização do estro foi realizada com o uso de dispositivos intravaginais (Progespon®, Coopers), por 12 dias e 400UI de gonadotrofina coriônica equina [eCG (Novormon®, Coopers)], aplicada no momento da remoção da esponja, quando receberam macho vasectomizado por até 60 horas. Após detecção do cio e às 36 horas da remoção das esponjas, as fêmeas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico por um período de 12 horas. As observações do status ovariano foram realizadas via laparoscopia, nos momentos 48, 52, 56, 60, 64, 68 horas após remoção das esponjas ou até que a ovulação fosse detectada. Os parâmetros utilizados para determinar a dinâmica ovariana foram: folículo< 5 mm; folículo≥ 5 mm, indicativos da condição pré-ovulatória; e folículo rompido, indicativo de ovulação.

Resultados e Discussão

O resultado da dinâmica ovariana nos momentos 48, 52, 56, 60, 64 e 68 horas está apresentado na Tabela 1. Foi observada maior concentração do momento da ovulação entre 64 e 68 horas pós-retirada do dispositivo vaginal. Nas condições deste experimento foi observado que as ovulações ocorreram tardiamente quando comparados com os protocolos de sincronização comumente utilizados. Cardwell et al. (1998) trabalhando com ovelhas mestiças de Dorset com Rambouillet, indicaram que o início de estro e a ovulação se manifestam mais rápida e uniformemente, como resultado da combinação do progestágeno com a eCG. Dias et al. (2001) sincronizaram fêmeas deslanadas e identificaram que a manifestação de estro começou por volta das 36 horas após a remoção do progestágeno e aplicação de 400 UI de eCG. A preconização da IA 48 horas após remoção de progestágenos se aplica a estas prévias observações de estro, associada com a prática de bovinos, onde ao observar as primeiras manifestações do estro devem-se empregar a inseminação artificial 12 horas após.

Estas diferenças entre resultados podem apontar que, possivelmente, em ovelhas da raça Santa Inês a ovulação pode ser mais tardia e consequentemente a utilização de sêmen congelado 48 horas após a remoção do dispositivo vaginal reduza os índices de prenhez por não haver proximidade do momento da ovulação com a oferta de sêmen, uma vez que o sêmen congelado apresenta menor viabilidade no trato reprodutivo da fêmea, por volta de seis horas (Watson, 2000). Se a ovulação ocorre por volta das 64 horas, as inseminações com sêmen congelado devem ser realizadas 60 horas após a remoção dos dispositivos.

Tabela 1 – Dinâmica ovariana observada por laparoscopias seriadas em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização do estro, expresso em porcentagem de fêmeas

Status Ovariano	**Laparoscopias seriadas (horas)**					
	48	52	56	60	64	68
Folículo < 5mm	100%	100%	50%	10%	-	-
Folículo ≥ 5mm	-	-	45%	60%	30%	-
Folículo rompido	-	-	5%	30%	70%	100%

Às 68 horas pós-remoção do progestágeno todas as fêmeas do programa apresentaram ovulação. Neste momento, a utilização de sêmen fresco ou refrigerado também reduziria os resultados de prenhez, visto que o sêmen fresco necessita de um período para que haja a capacitação espermática, habilitando esta célula para a fecundação e o óvulo, quando liberado, apresenta tempo útil entre 12 a 36 horas, podendo ocorrer fertilização de um oócito senescente e incidir em desenvolvimento anormal do zigoto, que pode ser incompatível com a viabilidade e a fêmea pode não levar a gestação a termo (Moraes, 1992).

Conclusões

A ovulação de fêmeas submetidas a um protocolo de sincronização do estro e programa de inseminação artificial ocorre entre 64 e 68 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais, sugerindo que o momento da inseminação artificial esteja compreendido entre 60 e 68 horas após a retirada do progestágeno.

Agradecimentos

Multiplic - Centro de saúde e reprodução animal / Androlab-UFRPE / Facepe.

Literatura citada

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

DIAS, F.E.F.; LOPES JUNIOR, E.S.; VILLAROEL, A.B.S.; et al. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica eqüina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 618-623, 2001.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; BARRETT, D.M.W.; et al. Use of high resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, p. 495-510, 2003.

MORAES, J.C.F. A mortalidade embrionária e a eficácia da inseminação artificial em ovinos. **Ciência Rural**, v. 22, p. 367-372, 1992.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

CERTIFICADO

Certificamos que VALDIR MORAIS DE ALMEIDA

Participou do Mini-Curso: IATF laparoscópica em pequenos ruminantes, durante a IV SEMANA DO MÉDICO VETERINÁRIO E VI CONGRESSO DE CAPRINOS E OVINOS".

Na qualidade de Ministrante
Promovido pelo Programa de Educação Tutorial de Medicina Veterinária (PET VET)

Sob a Coordenação da Professora Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

e com a supervisão desta Pró-Reitoria de Extensão. Carga Horária: 08 horas

Realizado no CEAGRI II

No dia 12 de novembro de 2012.

Recife, 13 de novembro de 2012.

Coordenador(a) de Educação Continuada

Pró-Reitor(a) de Extensão da UFRPE

Prof. Delson Laranjeira
Pró-Reitor da Extensão
UFRPE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

CERTIFICADO

Certificamos que VALDIR MORAIS DE ALMEIDA

Participou da Ação IV SEMANA DO MÉDICO VETERINÁRIO E VI CONGRESSO DE CAPRINOS E OVINOS, proferindo palestra intitulada: "Biotecnologia Aplicada em Embriões de Pequenos Ruminantes".

Na qualidade de Palestrante
Promovido pelo Programa de Educação Tutorial de Medicina Veterinária (PET VET)

Sob a Coordenação da Professora Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

e com a supervisão desta Pró-Reitoria de Extensão.

Realizado no CEAGRI II

No dia 14 de novembro de 2012.

Recife, 13 de novembro de 2012.

Coordenador(a) de Educação Continuada

Prof. João Morais de Jesus
Coordenador de Educação Continuada
PRAE/UFRPE

Pró-Reitor(a) de Extensão da UFRPE

Prof. Delson Laranjeira
Pró-Reitor da Extensão
UFRPE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **Valdir de Morais de Almeida** foi aluno regular do Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL** área de Concentração Genética molecular, Conservação de Germoplasma e Controle Reprodutivo em Ambiente Tropical, nível **Mestrado**, no período de março de 2011 a fevereiro de **2013**, participou como representante discente, como membro titular, do CCD deste Programa.

Recife, 18 de junho de 2013

Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
Coordenadora do PPGCAT/UFRPE

Rua Dom Manoel de Medeiros, S/Nº – CEP 52.171-900
Dois Irmãos – Recife-PE.
E-Mail:coordenacao@pgcat.ufrpe.br

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Resolução CCD/PPGCAT / nº 1.2012

Ementa: aprova a criação de normativas internas para a organização escrita e apresentação de Dissertação ou Tese defendidas no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical desta Universidade.

O Colegiado de Coordenação Didática do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da UFRPE, em sua Reunião Extraordinária realizada no dia 04 de setembro de 2012, examinando o expediente constante da comissão normativa de defesa de dissertação e tese e normativa para a organização escrita e apresentação de dissertação ou tesa e defendidas no programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical desta IES. O CCD - Colegiado de Coordenação Didática, à unanimidade de seus membros, resolve homologar o parecer favorável ao pleito.

RESOLVE:

Art. 1º – Aprovar, em atenção ao artigo 39, do capítulo VIII (das Dissertações e Teses), do regimento interno do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, normativas internas para a organização escrita e apresentação de Dissertação ou Tese defendida no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical desta Universidade.

Parágrafo 1º – A parte escrita da Dissertação ou Tese deverá ser organizada, como se segue:

- Capa – Deverá conter o nome da instituição com o símbolo respectivo e nome do programa de pós- graduação no alto; o título do trabalho; o nome do estudante; a localidade da defesa e o ano.

- Página de rosto – Deverá conter as informações presentes na capa, e as informações abaixo:

> "Tese (ou Dissertação) submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor (ou Mestre) em Ciência Animal Tropical.

Orientador e Co-orientador: Nome completo do orientador e do co-orientador, caso possua"

- Ficha catalográfica – Deverá estar presente no verso da página de rosto e seguir a orientação do setor responsável da Biblioteca Central desta IES. Abaixo, o texto a seguir deverá ser acrescentado:

"Tese (ou Dissertação) à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica."

- Folha de assinaturas:

Nome da Instituição, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Título da Tese (Dissertação). A seguir deve-se adicionar um espaço para o nome e assinatura do estudante, seguido da data de aprovação da Tese ou Dissertação. Abaixo, deverão ser relacionados os nomes e afiliações dos componentes da banca examinadora, iniciando-se pelo nome do orientador.

- Dedicatórias e/ou reflexões – Dedicatórias e reflexões, caso sejam incluídas, devem estar presentes em folhas separadas.

- Agradecimentos – Caso sejam incluídos, devem ser dirigidos aos colaboradores diretos e indiretos da pesquisa realizada, evitando-se agradecimentos de ordem pessoal não relacionados à mesma.

- Fontes financiadoras – As fontes financiadoras do projeto (bolsas, auxílios financeiros) devem ser relacionadas em uma folha em separado.

- Sumário – Deverá conter em detalhe as principais seções do trabalho.

- Lista de Figuras – Deve reproduzir o título de todas as figuras do trabalho, na ordem em que aparecem no texto, sem detalhamento de metodologias ou notas de rodapé.

- Lista de Tabelas - Deve reproduzir o título de todas as tabelas do trabalho, na ordem em que aparecem no texto, sem detalhamento de metodologias ou notas de rodapé.

- Abreviaturas e Definições – No caso de número significante de abreviaturas para palavras de terminologia incomum, deverá ser adicionada uma lista de abreviaturas com respectiva definição em uma folha em separado.

- A Tese (Dissertação) deverá usar letra Times New Roman, tamanho 12, espaçamento 1,5 entre linhas, margens superior e esquerda 2,5cm e inferior e direita 2,0 cm.

- Resumo – O resumo deve ser limitado a uma lauda, sem recuo e espaçamento simples. Deve expressar o objetivo principal do trabalho, a descrição geral da metodologia utilizada, os principais

resultados encontrados e a conclusão do trabalho. Seis palavras chaves, afora aquelas presentes no título, devem ser relacionadas após o resumo.

- Abstract – Deve reproduzir as mesmas informações do resumo na língua inglesa.

- Introdução (1 a 2 páginas) – deve contextualizar o problema abordado na pesquisa, enfatizando a importância do mesmo em relação ao conhecimento atual sobre o assunto.

- Revisão da Literatura – deve detalhar a problemática enfrentada à luz do conhecimento atual, apresentando de forma coesa a literatura recente sobre a temática em questão, e justificar o esforço científico com o projeto executado.

- Objetivo Geral – deve esclarecer o principal objetivo do trabalho.

- Objetivos Específicos – deve esclarecer os principais objetivos específicos que não estão implícitos no objetivo geral.

- Referências Bibliográficas (usar regras da ABNT).

- Artigos – deve apresentar os artigos produzidos ao longo do estudo, em língua portuguesa, de acordo com as normas do periódico ao qual o trabalho deverá ser ou foi enviado. Artigos já aceitos ou publicados em língua estrangeira devem ser incluídos como anexos.

- Considerações finais (facultativo) – deve apresentar uma discussão geral dos dados obtidos, considerando o resultado conjunto dos artigos da Dissertação ou Tese.

- Conclusão – deve apresentar a conclusão geral do trabalho fazendo referência ao objetivo geral do mesmo.

- Apêndices – deve ser adicionado no caso de material suplementar produzido pelo estudante.

- Anexos – deve ser adicionado no caso de material suplementar de outros autores, considerando a norma ética com referência aos autores, essencial a compreensão completa do estudo realizado.

Recife, 06 de dezembro de 2012

REVISTA CIÊNCIA RURAL

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos**, **revisões** e **notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem**.

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro: JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria: GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria: COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo: O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos: RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação: COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim: ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal: Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos: MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Artroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings…** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www.zh.com.br/especial/index.htm

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (**RBRA**) destina-se à publicação de artigos científicos, revisões (minirevisões, levantamentos bibliográficos), comunicações e relatos de casos, capazes de contribuir, significativamente, para um melhor conhecimento dos fenômenos ligados à reprodução animal, bem como para a divulgação da produção científica da área.
A RBRA, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente *on line* e está disponível no *website* do CBRA (http//:www.cbra.org.br).
Toda correspondência deverá ser encaminhada a:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrosio, Editor Chefe
Revista Brasileira de Reprodução Animal
E-mail: rbra@cbra.org.br
Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)
Alameda das Princesas, 1275, Bairro São José, 31275-180 Belo Horizonte, MG
Fone: (31)3491-7122; Fax: (31)3491-7025.
E-mail: cbra@cbra.org.br e *Website*: http://www.cbra.org.br

1. POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à RBRA serão preliminarmente avaliados quanto às normas e a adequação ao escopo da Revista. Somente os artigos aprovados nesta etapa serão encaminhados para a análise do mérito cientifico por consultores *ad hoc*.

2. TIPOS DE ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

- Artigo científico: é o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de resultados inéditos e posteriores ao planejamento da pesquisa.
- Revisão: análise e discussão do que há disponível na literatura científica e técnica atual sobre um determinado tema. As informações devem ser organizadas de maneira lógica e atrativa, com o objetivo de facilitar ao leitor o acompanhamento da evolução do assunto. As conclusões referem-se ao conjunto dos artigos revistos.
- Comunicação: é o relato sucinto de resultados de um trabalho científico adequadamente planejado.
- Relato de caso: é o relato de um caso raro, de forma completa e de interesse da clínica médico-veterinária.

3. NORMAS GERAIS

- Os artigos devem ser originais e destinados exclusivamente à publicação na RBRA.
- Os autores são responsáveis pelos resultados, pelos conceitos e pelas informações contidas nos artigos.
- A redação do artigo deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português. Para ortografia em português, adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Para ortografia em inglês, recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary.
- As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e os símbolos devem ser evitados, exceto quando forem usadas unidades padrão de medidas.
- Os artigos submetidos a aprovação deverão estar em consonância com as normas descritas no capítulo "Preparação do para submissão".

Submissão dos artigos

 Os artigos devem ser encaminhados exclusivamente, para o *e-mail* <rbra@cbra.org.br>. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.

Taxas de publicação

 O artigo recomendado só será publicado mediante o pagamento prévio da taxa de R$50,00 (cinquenta reais) por página publicada, a qual será cobrada do autor indicado para correspondência. Esta norma aplica-se aos artigos submetidos a partir de 01 de setembro de 2011.

4. PREPARAÇÃO DO TRABALHO PARA SUBMISSÃO

Texto e formato dos arquivos: o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem, fonte *Times New Roman* 12, espaço entrelinhas duplo, com linhas numeradas consecutivamente e paginadas sequencialmente. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com *Word for Windows.*

Tamanho do artigo: O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências bibliográficas, deverá apresentar no máximo 15 páginas (artigo de revisão), 15 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso) e 05 páginas (comunicação).

Seções de um artigo

Artigo científico: Título; Título em inglês; Autor (es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão (ou Resultados e Discussão); Conclusões; Agradecimentos; Referências bibliográficas; Ilustrações. O artigo científico deve conter no máximo 30 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Artigo de revisão: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Conclusões ou Considerações finais; Agradecimentos; Referências bibliográficas; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Comunicação: Mesma estrutura do artigo científico, de forma sucinta, mas sem subtítulos. A comunicação deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Relato de caso: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Metodologia diagnóstica utilizada; Resultados e Considerações finais; Ilustrações. O relato de caso deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de artigo devem se adaptar ao modelo):

- Título: O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências bibliográficas.
- Título em inglês: Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português.
- Autor(es): Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, prenomes e nomes intermediários representados pela inicial seguida de ponto, seguidos dos sobrenomes paternos por extenso. A afiliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome.
- Afiliação(ões): Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de filiação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail.
- Resumo: Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo.
- Palavras-chave: Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco.
- Abstract: Versão em inglês do Resumo.
- Keywords: Versão em inglês das Palavras-chave.
- Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.
- Material e Métodos: Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso

restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

- Resultados: Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados.
- Discussão: Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho.
- Conclusões: As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.
- Agradecimentos: Devem ser concisamente expressados.
- Referências bibliográficas: Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título.
- Ilustrações: Compreende as tabelas e as figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final. Recomendações: 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".
  Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.
  Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.tif, com alta resolução.

5. NORMAS PARA CITAÇÃO NO TEXTO E REDAÇÃO DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Citação bibliográficas no texto

A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o(s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(os) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979), **OU** (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Referências bibliográficas

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original (www.abnt.org.br).

Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL. Studies on Immunity to alphaviruses in foals. *Am J Vet Res*, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Waserman A, Schim FA, Franckel S. Anestesia geral del canino. *Not Med Vet*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

Dunne HW (Ed.). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. *Anais*... São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morril CC. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

Nutrient requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

Silva NQ. *Periotonioscopia na égua*. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

Documentos eletrônicos

- DOCUMENTO PUBLICADO DISPONIBILIZADO EM MEIO ELETRÔNICO

Arranjo tributário. *Diário do Nordeste On Line*, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em http://www.diariodonordeste.com.br.Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. *Anais* ... Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

Política. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em http://www.priberam.pt/dIDPLO. Acesso em 8 mar. 1999.

Quality food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www. org/critca16.htm>. Acesso em: 27 abr. 2000.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: Congressode Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em http://www.prospeq.ufpe.br /anais/anais/educ/ce04.htm. Acesso em 21 jan. 1997.

- Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; banco de dados. Disponível em http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves. Acesso em 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintened by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: lisserv@bdt.org.br. Acesso em 25 nov. 1998.

Civitas. Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: gcsnet.com.br/oamis/ civitas>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências bibliográficas. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

Artigos no prelo

Incluir na lista de referências bibliográficas apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

Informação pessoal

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".

6. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Não serão fornecidas separatas. Os artigos são disponibilizados no formato .pdf, no endereço eletrônico da revista (www.cbra.org.br).

A reprodução e a tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.