

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERÍSTICAS QUALIQUANTITATIVAS DE OÓCITOS
OBTIDOS POR *LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP*(LOPU) E DA
MATURAÇÃO NUCLEAR EM OVINOS

RENAN DENADAI

Botucatu – SP

Setembro de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERÍSTICAS QUALIQUANTITATIVAS DE OÓCITOS
OBTIDOS POR *LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP*(LOPU) E DA
MATURAÇÃO NUCLEAR EM OVINOS

RENAN DENADAI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Sony Dimas
Bicudo

Botucatu – SP

Setembro de 2013

Nome do Autor: Renan Denadai

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Denadai, Renan.

Características Qualiquantitativas de oócitos obtidos por
Laparoscopic Ovum Pick-up(LOPU) e da maturação nuclear em
ovinos / Renan Denadai. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Capes: 50504002

1. Ovino. 2. Reprodução animal. 3. Técnicas de
maturação in vitro de oócitos. 4. Hormônio
folículo-estimulante. 5. Laparoscopia. 6.
Ultrassonografia.

Título: CARACTERÍSTICAS QUALIQUANTITATIVAS DE OÓCITOS
OBTIDOS POR *LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP*(LOPU) E DA
MATURAÇÃO NUCLEAR EM OVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Titular Sony Dimas Bicudo

Presidente e Orientado

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professora Titular Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Doutor Antônio Sérgio Villas Boas

Membro

Data da Defesa: 27 de setembro de 2013

DEDICATÓRIA

“A todos familiares, amigos, namorada e professores, sem os quais não poderia realizar nada em minha vida, e em especial ao meu filho Joaquim”

AGRADECIMENTOS

A meu pai Benedito Sérgio e minha Mãe Mara pelo suporte emocional e financeiro por toda a vida.

Aos meus amigos pelo companheirismo e diversão.

A minha namorada pelo carinho e amor.

Professor Sony pela paciência e sabedoria.

A banca examinadora pela compreensão e ajuda.

Prof. Fernanda, Prof. Meira e Prof. Eunice por contribuírem com equipamentos para desenvolver a pesquisa.

Aos pós-graduandos Leticia, Hyago, Leandro, Claudia, Tassia e Luana.

Todos os funcionários da FMVZ-Unesp-Botucatu, em especial os do departamento de reprodução.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Média $\pm$ dp da população de folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$), presentes á avaliação ultrassonográfica realizada a cada 8 horas, após LOPU e superestimulação ovariana.	22
Tabela 2 - Média $\pm$ dp da população de folículos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ e $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$) presentes nos ovários ao exame ultrassonográfico, imediatamente antes da LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento <i>One Shot</i> ou DLOPU.....	24
Tabela 3 - Média $\pm$ dp da população de folículos ovarianos presentes á avaliação ultrassonográfica imediatamente antes da LOPU, número de folículos aspirados e numero de oócitos obtidos, em ovelhas submetidas ao tratamento hormonal <i>One Shot</i> ou DLOPU e porcentagem da média oócitos recuperados em relação a média de folículos aspirados.....	25
Tabela 4 - Média $\pm$ dp do numero de oócitos obtidos após LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento <i>One Shot</i> ou DLOPU. Avaliados em relação a qualidade dos <i>cumulus oophurus</i> COCs, divididos em viáveis(Grau 1, Grau 2, e Grau 3) e não viáveis (desnudos, expandidos e degenerados-DED).....	26
Tabela 5 - Média, $\pm$, dp e porcentagem do número de COCs obtidos por LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento <i>One Shot</i> , avaliados quanto a expansão das células do cúmulo após 24 horas de MIV, divididos em expansão total, parcial e ausente....	26

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1 - Representação esquemática do Experimento 1.** LOPU= aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF2 α =cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio folículo estimulante; US=exame ultrassonográfico; h=horas; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..... **12**
- Figura 2 - Representação esquemática do Experimento 2, One Shot.** LOPU= aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF2 α =cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio folículo estimulante;; h=horas; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..... **13**
- Figura 3 - Representação esquemática do Experimento 2, One Shot.** LOPU₁= primeira aspiração folicular por laparoscopia, LOPU₂= segunda aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF2 α =cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio folículo estimulante; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..... **14**
- Figura 4 – (A)** Sonograma de ovário submetido a protocolo superestimulatório em momento imediatamente antes a realização da LOPU; **(B)** Representação esquemática sobrepondo sonograma do ovário, e destacando a presença de múltiplos folículos..... **16**

Figura 5 - (A) procedimento de laparoscopia para realização da LOPU; (B) Trocateres para realização da LOPU, 1 trocater para inserção da ótica, 2 e 3 trocateres para inserção da pinça de manipulações e sistema de aspiração.....	17
Figura 6 - (A) Bomba de vácuo digital BV 003i WTA; (B) 1 Linha para aspiração folicular, 2 Haste metálica para aspiração folicular, 3 Rolha de alumínio para aspiração folicular; (C) Indicador digital de pressão do vácuo para aspiração folicular da Bomba de vácuo digital BV 003i WTA ; (D) Indicador digital de temperatura do aquecedor de tubos falcon da Bomba de vácuo digital BV 003i WTA.....	18
Figura 7 – (A) Acesso ao abdômen para realização da irrigação das estruturas abdominais com solução fisiológica heparinizada (1%); (B) Sutura realizada nos locais de inserção dos trocateres.....	18

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 – Introdução.....	1
2 - Revisão da literatura.....	2
2.1 - Foliculogênese e desenvolvimento folicular.....	2
2.1.1 - Avaliação ultrassonográfica do desenvolvimento folicular.....	3
2.2 Técnicas para obtenção de oócitos.....	4
2.2.1 Aspiração folicular por laparoscopia.....	5
2.3 Técnicas de superestimulação.....	6
2.4 Estratégias para controle da população folicular ovariana.....	6
2.4.1 Progestagenos associados a estrógenos.....	6
2.4.2 GnRH.....	8
2.4.3 Ablação Folicular.....	9
2.5 Maturação oocitária.....	10
3 - Objetivos.....	10
3.1 - Objetivo principal.....	10
3.2 - Objetivos específicos.....	11
4 - Materiais e Métodos.....	11
4.1 - Animais e local de experimentação.....	11
4.2 - Delineamento experimental:.....	12
4.2.1- Experimento 1.....	12

4.2.2 - Experimento 2.....	Pág.
4.2.2.1- Caracterização das Etapas e dos	12
Tratamentos Experimentais:.....	
a) Etapa I.....	13
b) Etapa II.....	13
4.3 – Metodologias.....	14
5 - Resultados.....	21
5.1 - Constatação da ciclicidade.....	21
5.2 - Avaliação do procedimento laparoscópico.....	21
5.3 - Experimento 1.....	22
5.3.1 - Determinação do momento ideal para a LOPU.....	21
5.4 - Experimento 2.....	21
5.4.1 - População folicular e COCs obtidos.....	23
5.4.2 - Avaliação imediata dos COCs obtidos.....	23
5.4.2 - Avaliações pós cultivo por 24 horas.....	25
6 – Discussão.....	25
6.1 - Constatação da ciclicidade.....	27
6.2 - Procedimento laparoscópico.....	27
6.3 Momento ideal para a LOPU.....	28
6.4 População folicular e COCs obtidos.....	28
6.5 Avaliação imediata dos COCs.....	29
6.6 Avaliações pós cultivo por 24 horas.....	30
6.7 Tratamento DLOPU.....	31
7 - Conclusões.....	31
8 - Bibliografia.....	32
9 -Trabalho científico.....	41

DENADAI, R **Características quali-quantitativas de oócitos obtidos por laparoscópico ovum pick-up(lopup) e da maturação nuclear em ovinos.** Botucatu, 2013. 56p. Dissertação Mestrado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a resposta ovariana a superestimulação utilizando 80UI de FSH e 300UI de eCG após ablação por *laparoscopic ovum pick-up* (LOPU₁) de todos os folículos visíveis presentes em ambos os ovários. Determinar o melhor momento para realização de uma nova LOPU (LOPU₂), mediante a avaliação ultrassonográfica dos ovários a cada 12 horas após LOPU₁. E comparar a respostas ovariana do tratamento Duplo LOPU (DLOPU) com o tratamento *One Shot* adaptado de Baldassarre (1996), quanto a quantidades dos Complexos *Cumulos*-Oócito (COCs), e qualidade das estruturas obtidas e após processo de maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas. Foi determinado o momento para realização da LOPU₂ em 36 horas após a superestimulação. A média de folículos presentes na avaliação ultrassonográfica imediatamente antes a LOPU em ambos os tratamentos foi cerca de 9 estruturas, não diferindo da média de folículos aspirados, a taxa de recuperação comum aos dois tratamentos foi de 62,5%. A avaliação imediata das estruturas obtidas bem como a após 24 de MIV demonstrou que não houve diferença qualitativa COCs entre os tratamentos.

Palavras-chave: LOPU, Ovino, Controle Folicular, MIV, Ultrassonografia.

DENADAI, R. **Qualitative and quantitative features of oocytes obtained by laparoscopic ovum pick-up (lopu) and nuclear maturation in sheep.** Botucatu, 2013. 56p. Dissertação Mestrado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the ovarian response to superstimulation using 80UI FSH and eCG 300UI after ablation LOPU (LOPU1) of all follicles present in both ovaries. Determine the best time to make a new LOPU (LOPU2) by ultrasound evaluation of the ovaries every 12 hours LOPU1. And comparing the responses ovarian DLOPU treatment with the treatment Ono Shot adapted Baldassarre (1996) with the DLOPU described here, the amounts of COC and quality of the structures obtained after process and IVM for 24 hours. It was determined the time for completion of LOPU2 in 36 hours after the overstimulation. The mean number of follicles present in the ultrasonographic evaluation immediately before the LOPU in both treatments was about 9 structures did not differ from follicles aspirated media, the recovery rate common to the two treatments was 62.5%. Immediate assessment of the structures obtained as well as after 24 IVM demonstrated that COCs do not have qualitative difference between treatments.

Keywords: LOPU, ultrasound, MIV, Sheep.

1 - Introdução

Segundo dados do censo rural realizado em 2006, com cerca de 13,8 milhões de cabeças (IBGE, 2006), a ovinocultura brasileira encontrasse em pleno desenvolvimento, demonstrando um enorme potencial econômico (SANTOS et al., 2009). No estado de São Paulo a ovinocultura cresce a cada dia aumentando sua importância como atividade produtiva (BICUDO, 2005).

Uma intensificação na cadeia produtiva é necessária para atender mercado consumidor, bem como aumentar o retorno econômico dos produtores. O estudo e aperfeiçoamento de técnicas da reprodução se mostra importante nestes aspectos, visando elevar os índices produtivos, possibilitando um incremento na produção de carne ovina no país (FONSECA, 2006).

Técnicas como inseminação artificial (IA), superovulação, transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* (PIV) servem como ferramentas produtivas, acelerando os programas de melhoramento genético do rebanho através do aumento da população de animais com características zootécnicas superiores (FONSECA, 2006).

Porém, as técnicas que visam a superovulação ou superestimulação para programas de TE e PIV possuem uma limitação, a grande variabilidade da resposta aos tratamentos, dentre vários fatores, a presença de folículos dominantes no momento do início do tratamento demonstra grande relevância (TERVIT et al., 1992; BALDASSARRE et al., 1994). A resposta superestimuladora ovariana ao FSH é diretamente proporcional ao número de pequenos folículos entre 1 e 2mm, porém é inversamente proporcional a presença de grandes folículos, maiores ou iguais a 5mm (BREBION & COGNIÉ, 1989; COGNIÉ, 1999).

Com a realização desse estudo pretendeu-se determinar a eficiência de estratégia de homogeneização do crescimento folicular ovariano em ovelhas, após aspiração folicular e superestimulação ovariana, para obtenção de complexo *cumulus*-oócito (COC) homogênea e com competentes, tomando-se como referência, a maturação nuclear.

2 - Revisão da literatura

2.1 - Foliculogênese e desenvolvimento folicular

Durante o desenvolvimento embrionário, logo após a diferenciação sexual, a qual ocorre cerca de 35 dias após a fecundação na espécie ovina, se inicia o processo de formação dos folículos ovarianos, células da linhagem germinativa que povoam as gônadas primordiais, dando origem às ovogonias. Estas células presentes na cortical dos ovários sofrem diversas divisões mitóticas (SAWYER et al., 2002). As ovogonias são circundadas por células de origem epitelial, dando origem à pré-granulosa, e iniciam a divisão meiótica que dará origem ao gameta feminino, parando no diplóteno da prófase I, originando ao folículo primordial (LUNDY et al., 1999).

Na fase púbere, por ação de fatores neuroendócrinos, é retomado o desenvolvimento destas estruturas, onde ocorre o recrutamento de um pool de folículos, sendo que uma ínfima quantidade destas estruturas chegará de fato à ovulação e terá um real potencial fertilizante (HAFEZ & HAFEZ, 2000). A partir desse momento, as fêmeas começarão a exercer uma função reprodutiva marcada por um ciclo estral de 17 dias. Os ovinos são animais poliêstricos estacionais e apresentam ciclo estral em períodos do ano determinados pelo fotoperíodo (ARENDT, 1995).

O anestro é um período caracterizado pela ausência de ovulação, por períodos prolongados, dependentes de fatores como a nutrição, gestação, raça, idade e localização em relação ao equador; nesta fase os ovários estarão com baixa atividade, porém ainda com desenvolvimento folicular (BARTLEWSKI et al., 1998). O anestro estacional é resultante de uma estimulação insuficiente de GnRH sobre a hipófise, gerando uma produção insatisfatória de gonadotrofinas para que ocorra a ovulação.

O controle do ciclo estral se dá por uma inter-relação entre os hormônios produzidos no eixo hipotálamo, hipófise, ovários e útero (SCARAMUZZI et al., 2011). A liberação do GnRH pelo hipotálamo leva a uma estimulação positiva para a produção de LH e FSH pela pituitária, estas duas gonadotrofinas atuam

principalmente nos ovários, estimulando o desenvolvimento folicular e produção de estrógenos e progesterona, que pode culminar em uma ovulação ou uma auto regulação do ciclo, sendo que essa ocorre por retro alimentação negativa, e novo crescimento folicular (MCNEILLY et al., 2001).

O oócitos, as células da teca e da granulosa possuem papel importante na regulação do desenvolvimento folicular, produzem uma serie de fatores de crescimento de ação autócrina e parácrina, sendo estes os principais responsáveis pelo desenvolvimento na fase pré-antral, ou seja, um desenvolvimento independente de gonadotrofinas (SCARAMUZZI et al., 2011).

O surgimento e crescimento dos folículos acontecem em ondas, de 2 a 5 ondas entre estros nas ovelhas, sendo que o predomínio da ocorrência é de 3 ondas (GINTHER et al., 1995; BARTLEWSKI et al., 1999; LEYVA et al., 1999; VIÑALES et al., 1999).

De acordo com progressão do crescimento do folículo este se torna cada vez mais dependente das gonadotrofinas. O FSH tem papel no recrutamento e crescimento inicial dos folículos antrais (SCARAMUZZI et al., 2011). Na espécie ovina a dependência do folículo por gonadotrofinas ocorre a partir de um grau morfológico de 2mm detectado por ultrassonografia, ocorrendo atresia em concentrações insuficientes das mesmas (DRIANCOURT, 2001). Existem evidencias que mudanças nas concentrações de FSH estão intimamente relacionadas ao surgimento de novas ondas de desenvolvimento folicular (BAIRD et al., 1991).

Folículos acima de 5mm são considerados estruturas com potencial ovulatório, porém na espécie ovina a definição de dominante não se encaixa perfeitamente, o maior folículo não necessariamente será o que ira ovular. (SOUZA et al., 1997; VINÖLES et al., 1999). A utilização do termo folículo ovulatório se encaixa melhor na fisiologia da ovelha, sendo esse, na ausência de um corpo lúteo funcional, após um pico endógeno ou exógeno de LH, há o processo de ovulação (WEBB et al., 1992).

2.1.1 - Avaliação ultrassonográfica do desenvolvimento folicular

A avaliação ultrassonográfica dos ovários de ovelhas pode ser realizada utilizando um transdutor de 7,5 MHz, linear com haste rígida desenvolvido para avaliação prostática em humanos, assim permitindo o escaneamento da gônada e identificação dos folículos como estruturas circulares anecóicas, e corpos lúteos como, estruturas circulares hiperecóica em relação ao estroma ovariano. (RAVINDRA et al., 1994).

Rubianes descreveu em 2000 que o acompanhamento da dinâmica folicular via ultrassonografia, associada aos perfis endócrinos de hormônios reprodutivos séricos permitiu um grande avanço nos conhecimentos da fisiologia ovariana em pequenos ruminantes.

2.2 - Técnicas para obtenção de oócitos

A obtenção de oócitos de animais domésticos atualmente pode ser realizada *in vitro* através de ovários obtidos de abatedouros ou por técnica de ovariectomia, ou métodos *in vivo*, utilizando laparotomia, laparoscopia ou aspiração transvaginal guiada por ultrassom (ARMSTRONG et al., 1997).

Para fins de pesquisa, a obtenção de oócitos em laboratórios através da aspiração de ovários oriundos de matadouros é uma técnica de menor custo, sendo estes transportados em solução salina tamponada fosfatada (PBS) ou em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% entre 35 e 37°C, associados a antimicrobianos (WANI, 2002). Porém quando se visa programas de melhoramento genético, tal técnica possui valor limitado, pois não há informações sanitárias e produtivas das fêmeas doadoras (ARMSTRONG et al., 1997), lembrando que, na espécie ovina, a maioria das fêmeas abatidas são descartes do plantel.

A obtenção de oócitos através de aspiração folicular é uma técnica comum e rotineira nos rebanhos bovinos (ARMSTRONG et al., 1994). Contudo, sua utilização em pequenos ruminantes, comparada a espécie bovina, ainda é muito restrita (BALDASSARRE et al., 1994).

Devido a limitações anatômicas nos pequenos ruminantes, que inviabilizam a palpação retal, a laparotomia vem sendo amplamente empregada como método

de colheita de oócitos (PTAK et al., 1999). Apesar de inicialmente apresentar melhores taxas de recuperação, sua sucessiva utilização pode levar a formação de aderências no trato reprodutivo, reduzindo essas taxas e podendo culminar na esterilização da fêmea doadora (VALLET et al., 1987).

2.2.1 - Aspiração folicular por laparoscopia

Em ovinos, a aspiração folicular por laparoscopia (Laparoscopic Ovum Pic-Up - LOPU) vem se firmando como ferramenta biotecnológica para obtenção de estruturas do COC, destinados à produção *in vitro* de embriões, essa pratica visa o melhoramento genético ou modelo experimental nas técnicas de reprodução assistida com clonagem e transgenia (TERVIT et al., 1995, STANGL et al., 1999 BALDASSARRE et al., 2002,)

Em 1974, Snyder e Dukelowfirst descreveram a primeira aspiração folicular na espécie ovina, porém sua utilização na produção de embriões *in vitro* só foi relatada 16 anos mais tarde por Czlonkowska (1991). A partir de então, vários grupos de pesquisadores têm descrito a viabilidade desse método para obtenção de oócitos de doadoras *in vivo*, bem como a sua utilização para produção *in vitro* (PIV) de embriões ovinos (BALDASSARRE et al., 1994, 2002; GRAFF et al., 1999).

Comparada a técnica de obtenção de oócitos por laparotomia, que apresenta maior risco de ocorrência de aderências periovarianas, a aspiração por laparoscopia permite sessões repetidas de coleta com poucos riscos para a fertilidade futura da fêmea doadora (STANGL et al., 1999).

Os procedimentos de aspiração incluem a contenção adequada do animal e utilização de anestesia geral. Observando o ovário por via laparoscópica, os folículos são aspirados um a um, utilizando-se pipeta plástica agulhada, acoplada a um sistema de aspiração a vácuo (BALDASSARRE et al., 1994, 2003).

Por reduzir o trauma cirúrgico, quando comparada a outras formas de obtenção de oócitos, e possibilitar colheitas repetidas, a LOPU tende a se firmar como técnica de aspiração folicular na espécie ovina (COGNIÉ, 1999; STANGL et al., 1999). Além disso, ela amplia a produção de descendentes, pois a permite em

situações onde as tecnologias de produção de embrião *in vivo* não se aplicam como animais pré-púberes, gestantes ou com idade avançada (BALDASSARRE et al., 2002).

2.3 - Técnicas de superestimulação

A utilização de tratamentos de superestimulação ovariana em ovinos é de extrema importância para elevar os índices de obtenção oocitária, relacionados à quantidade e qualidade COC (BALDASSARRE et al., 1996; COGNIÉ et al., 2003). Dentre os protocolos de superestimulação se destacam os que empregam dose única de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (STANGL et al., 1999), além dos tratamentos com doses decrescentes de eCG ou hormônio folículo estimulante (FSH) (BALDASSARRE et al., 1996; PTAK et al., 1999).

A resposta superestimulatória está relacionada ao número de pequenos folículos antrais, menores do que 2 a 3mm no início do tratamento, sendo que a presença de folículos maiores do que 5mm afetam negativamente essa resposta (BREBION et al., 1992, COGNIÉ, 1999).

Agonistas e antagonistas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), podem ser usados em associação a progestágenos, suprimindo a produção de gonadotrofinas endógenas, impedindo o desenvolvimento de folículos além de 2 a 3mm, resultando na elevação em 50 % das taxas de resposta ao tratamento com FSH (BREBION et al., 1992; COGNIÉ, 1992). O protocolo utilizando em aplicação única de 80mg de FSH associado a 300UI de eCG, descritos por Baldassarre (1996) merece destaque, tendo média de recuperação de 13,4 oócitos por doadora.

2.4 - Estratégias para controle da população folicular ovariana

Vários métodos vêm sendo utilizados para controlar a população folicular em ovelhas, com o intuito principal de elevar a eficiência a tratamentos superestimulatórios, alguns deles estão descritos abaixo.

2.4.1 - Progestagenos associados a estrógenos

O principal hormônio esteróide produzido pelo corpo lúteo é a progesterona (GORDON, 1997), através de um mecanismo de feedback negativo esta reduz a secreção de LH na adenohipófise, impedindo o pico pré-ovulatório e consequentemente nova ovulação (KARSCH et al., 1999).

Utilização de progestágenos ou progesterona natural vem sendo amplamente utilizados em protocolos hormonais para sincronização do estro em ovelhas, porém com alta variabilidade no momento ovulatório, dependendo da população folicular no momento de sua retirada (GORDON, 1997). Nos protocolos tradicionais podem ser utilizados dispositivos vaginais de progesterona natural, pessários vaginais de acetato de medroxiprogesterona ou ainda implantes subcutâneos de norgestomet, durante períodos similares aos do corpo lute durante um ciclo estral normal para esta espécie (RUBIANES, 2000).

As variações nas concentrações de progesterona séricas em um ciclo normal tendem a aumentar gradualmente até chegar a um platô e reduzir durante o período de luteólise, sendo o oposto quando se compara ao perfil sérico estabelecido durante os protocolos hormonais em que um abrupto incremento desse hormônio ocorre com a colocação do dispositivo (MENCHACA & RUBIANES, 2004).

Estrógeno, estrona e estradiol 17β são os principais hormônios esteroides produzidos pelos folículos (GORDON, 1997). Eles aumentam os receptores para GnRH na hipófise sendo importantes para o processo de ovulação (KARSCH et al., 1997).

Na espécie bovina a utilização do benzoato estradiol para induzir a o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular vem sendo largamente utilizado com grande sucesso (BÓ et al., 1991; BÓ et al., 2000). Porém quando associado a progesterona ou progestagenos em ovelhas durante estação de monta não foi capaz de levar a regressão do folículo dominante e novo recrutamento (TAKADA, 2004).

Semelhante ao que acontece na espécie bovina, em ovinos tratados com o estradiol- 17β no momento da utilização da progesterona ou progestagenos ocorre

a regressão do folículo dominante e surgimento de uma nova onda de crescimento folicular três dias após a sua administração (MEIKLE et al., 2001; UNGERFELD et al., 2004).

2.4.2 - GnRH

O GnRH é um decapeptídeo produzidos por neurônios localizados no núcleo arqueado. Tem terminações nervosas em varias regiões do sistema nervoso central onde ele atua como neurotransmissor modulador das funções reprodutivas. Ao ser liberado no sistema porta epifisário o GnRH vai atuar nos receptores localizados na membrana plasmática dos gonadotrofos (CONN & CROWLEY, 1991; ULLOA-AGUIRRE & TIMOSSO, 2000).

GnRH atua na hipófise levando a síntese das gonadotrofinas, LH e FSH, sendo que sua liberação ocorre de forma pulsátil (SANTEN & BARDIN, 1973; KNOBIL, 1974), uma liberação intermitente deste hormônio é importante para que não ocorra dessensibilização dos receptores, sendo essencial para controle da função das gônadas (BELCHETZ et al., 1978; CROWLEY et al., 1985; CONN et al., 1987; HAZUM & CONN, 1988).

Uma continua exposição ao GnRH induz a interrupção na secreção de LH e FSH por um mecanismo de *down regulation*, consequentemente levando a supressão da atividade ovariana (BERTSCHINGER et al., 2001; MUNSON et al., 2001). Acredita-se que este fato ocorra por uma internalização ou degradação dos receptores de membrana do GnRH nos gonadotrofos, ou ainda por um desacoplamento do receptor ao seu segundo mensageiro intracelular (D'OCCHIO et al., 2000).

Existem cerca de 2000 análogos sintéticos do GnRH (PADULA, 2002), entre tantos agonistas os mais utilizados na reprodução na espécie ovina são deslorelina (HUDSON et al., 1999), gonadorelina (TAKADA et al., 2003; LUTHER et al., 2007), buserelina (MCNEILLY & FRASER 1987; PICTON et al., 1990; MARTEMUCCI & D'ALESSANDRO, 2010) e ovalbumina-LHRH-7 (GÖKDAL et al., 2009).

É possível bloquear de maneira reversível a secreção de gonadotrofinas através de aplicações diárias de agonistas do GnRH, durante um período de 2 semanas ou mais, levando a uma dessensibilização dos receptores do GnRH e um predomínio de folículos entre 1 e 2mm durante duas semanas ou mais (BREBION et al, 1992).

A utilização do mesmo protocolo de 10 dias porém utilizando um antagonista do GnRH é possível, levando a uma supressão do LH consequentemente ausência de folículos dominantes ao final do tratamento (DUFFOUR et al., 2000; COGNIÉ et al., 2003; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002).

Foram propostos alternativas para minimizar o longo período de aplicação do antagonista do GnRH, também resultando em supressão das gonadotrofinas e predomínio de folículos menores que 2mm, utilizando 5 aplicações (COGNIÉ et al., 2003), ou utilizando única aplicação com longa duração na ação (LÓPEZ-ALONSO et al., 2005).

Ao substituir a glicina na posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-prolinamida)-10-Desglicinamida LH-RH) é produzido um análogo do GnRH, o acetato de deslorrelina, com potencial total biológico de 10 e 144 vezes maior do que GnRH (PADULA, 2002), que induz a uma liberação 7 vezes maior de LH e possui uma taxa de degradação mais lenta que o GnRH (COY & SCHALLY, 1978).

Este análogo ao GnRH vem sendo usado em diversas espécies para o controle do ciclo estral, sendo utilizado principalmente na forma de implantes subcutâneos, que leva a uma liberação lenta e gradual do princípio ativo, inibindo temporariamente e reversivelmente a produção de gonadotrofinas e esteroides sexuais (TRIGG et al., 2001; WRIGHT et al., 2001; ROMAGNOLI et al., 2009),

Ao utilizar estes implantes subcutâneos de acetato de deslorrelina na espécie ovina, com finalidade de atrasar a estação reprodutiva, o tratamento induziu a supressão do estro durante sua utilização (GÜNGÖR, et al., 2007) .

2.4.3 - Ablação Folicular

Nos animais domésticos existem vários métodos descritos para a ablação folicular, que consistem na remoção mecânica dos folículos. Entre elas a punção guiada por ultrassom através da fossa para lombar (CALLESEN et al., 1987), ou por via transvaginal (PIETERSE et al., 1988; PIETERSE et al., 1991), cauterização por via laparoscópica ou laparotomia (KO et al., 1991; ADAMS et al., 1994; BERGFELT et al., 1994), por compressão mecânica via palpação retal (HANH, 1993) ou por via transvaginal utilizando agulha longa guiada pela palpação retal (ALI et al., 2001).

Em bovinos é descrito que a remoção mecânica por aspiração transvaginal guiada por ultrassom, de folículos maiores ou iguais a 5mm, em dias aleatórios do ciclo, associado a protocolos de superestimulação leva a emergência de nova onda de crescimento folicular, caracterizada por folículos mais responsivos à ação do FSH (KIM et al., 2001).

2.5 - Maturação oocitária

Os eventos citoplasmáticos entre os bloqueios meióticos nos estadios de prófase I e Metafase II que garante ao oócito a capacidade de ser fertilizados correspondem a maturação oocitária (EPPIG et al., 1996), sendo assim corresponde a uma importante etapa para a produção de embriões (MERMILLOD et al. 1999).

A maturação nuclear e maturação citoplasmática, apesar de eventos distintos são interligadas, e ocorrem de maneira simultânea (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 1999), sendo que a maturação nuclear inicia com a quebra da vesícula germinativa e finaliza com o termino da meiose, que é marcada pela expulsão do segundo corpúsculo polar (TOSTI, 2006).

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo principal

Estudar a resposta ovariana a superestimulação após remoção mecânica por LOPU de folículos visíveis, bem como das características qualitativas das estruturas obtidas após aspirações sequenciais e tratamento superestimulatório.

3.2 - Objetivos específicos

- Utilizar a avaliação ultrassonográfica da dinâmica folicular para conhecer o padrão de crescimento das estruturas ovarianas após LOPU seguida de superestimulação;
- Avaliar e comparar qualitativamente os COCs obtidos através da aspiração sequencial;
- Avaliar o efeito da aspiração sequencial sobre a competência de maturação nuclear *in vitro* dos oócito.

4 - Materiais e Métodos

4.1 - Animais e local de experimentação:

A experimentação com as ovelhas foi conduzida no “Laboratório de Estudos de Biotecnologia Aplicada a Reprodução de Ovinos e Caprinos” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ – UNESP, no município de Botucatu-SP; situado à latitude de 22°53'09” sul e longitude de 48°26'42” oeste, altitude de 804 metros, no período entre agosto e dezembro de 2012.

Foram utilizadas ovelhas mestiças adultas selecionadas quanto ao estado corporal, estado clínico e estatus reprodutivo, recebendo durante o período experimental água e sal mineral *ad libitum* e ração completa peletizada para manutenção de ovelhas adultas. A ciclicidade ovariana foi constatada por meio de dosagem pareada de progesterona e detecção ultrassonográfica da presença de corpo lúteo.

No “Laboratório de Endocrinologia” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia foi o local de realização das dosagens hormonais, e no “Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA)” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu, onde foram realizadas as avaliações dos COCs e processo de MIV.

4.2 - Delineamento experimental:

4.2.1 - Experimento 1

O Experimento 1 foi conduzido com o objetivo de determinar o momento de maior população de folículos detectáveis com diâmetro entre 2,5 e 4,5mm à ultrassonografia, acompanhando-se o padrão de crescimento folicular após LOPU seguida de superestimulação.

Foram utilizadas cinco ovelhas adultas mestiças submetidas ao tratamento abaixo descrito (Figura 1)

Constatada a ciclicidade ovariana (Figura 1), as ovelhas (n=5) receberam pessário intravaginal de 60mg de acetato de medroxiprogesterona (PROGESPON[®]), mantido por 10 dias, com aplicação no quarto dia de 100µg de cloprostenol (Ciosin[®]). Após remoção do pessário intravaginal foi realizada a LOPU de todos os folículos visíveis e administrado 80mg de FSH (Folltropin[®] V Bioniche Animal Health Product – Canada) associada a 300UI de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina - Novormon[®] - Schering-Pough). A avaliação ultrassonográfica do padrão de crescimento folicular foi realizada a cada 8 horas durante o período de 64 horas.

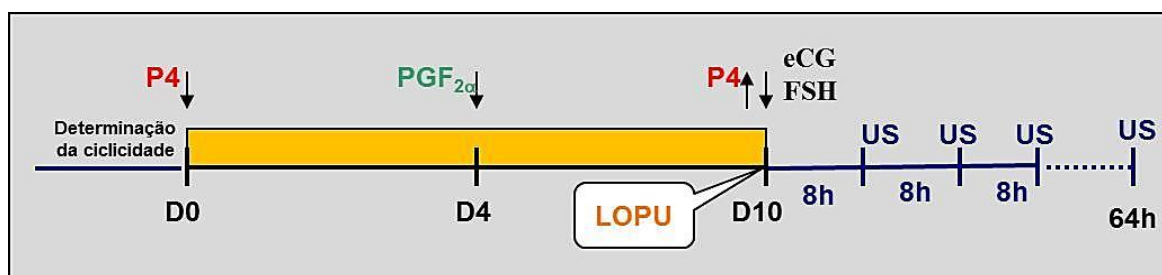


Figura 1 – Representação esquemática do Experimento 1. LOPU= aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF_{2α}=cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio foliculo estimulante; US=exame ultrassonográfico; h=horas; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..

4.2.2 - Experimento 2

O Experimento 2 objetivou comparar o tratamento segundo o protocolo superestimulatório *One Shot* adaptado de Baldassarre (1996), com aquele de homogeneização do crescimento folicular ovariano por LOPU sequencial (DLOPU).

4.2.2.1- Caracterização das Etapas e dos Tratamentos Experimentais:

Constatada a ciclicidade ovariana as ovelhas foram aleatoriamente destinadas a um dos dois Tratamentos Experimentais:

a) Etapa I – (Experimento 2)

Tratamento 1 – One Shot (Figura 2): Teve como base o protocolo de preparação à LOPU descrito por Baldassarre (1996), em que as ovelhas receberam pessário intravaginal de 60mg acetato de medroxiprogesterona (PROGESPON® - Coopers Saúde Animal), mantido por 10 dias, com aplicação no quarto dia de 100µg de cloprostenol (Ciosin® - MSD Saúde Animal). Concomitante à remoção do pessários intravaginal foi realizada a administração de 80mg de FSH (Folltropin® V Bioniche Animal Health Product – Canada) associado a 300UI de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina - Novormon® - Schering-Pough). Decorridas 36 horas do tratamento superestimulatório, foi realizada LOPU de todos os folículos, visíveis na superfície ovariana e os COCs obtidos, encaminhados para análise qualitativa e maturação nuclear.

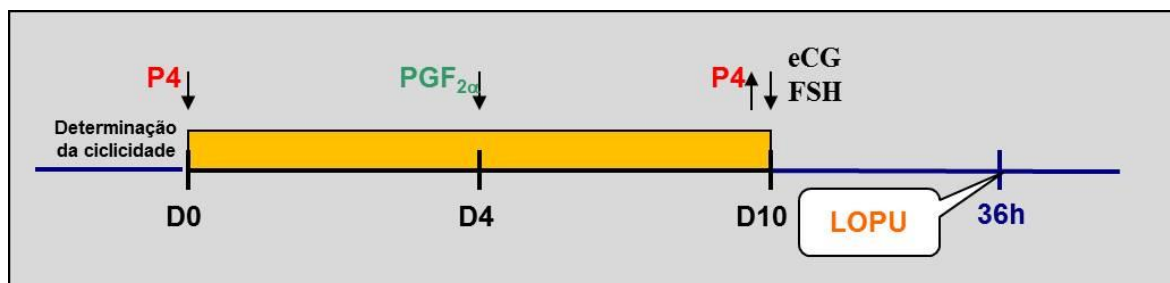


Figura 2 – Representação esquemática do Experimento 2, One Shot. LOPU= aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF2α=cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio foliculo estimulante;; h=horas; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..

Tratamento 2– DLOPU (Figura 3): Os animais receberam pessário intravaginal de 60mg acetato de medroxiprogesterona (PROGESPON® - Coopers Saúde Animal), mantido por 10 dias, com aplicação no quarto dia de 100µg de cloprostenol (Ciosin® - MSD Saúde Animal). No decimo dia após a LOPU₁, aspiração de todos os folículos visíveis na superfície ovariana, foi realizada a remoção do pessário intravaginal e administração de 80mg de FSH (Folltropin® V Bioniche Animal Health Product – Canada) associado a 300UI de eCG

(Gonadotrofina Coriônica Equina - Novormon[®] - Schering-Pough), decorrido 36 horas, nova sessão de aspiração (LOPU₂) foi realizada e os COCs obtidos, encaminhados para análise qualitativa e maturação nuclear.

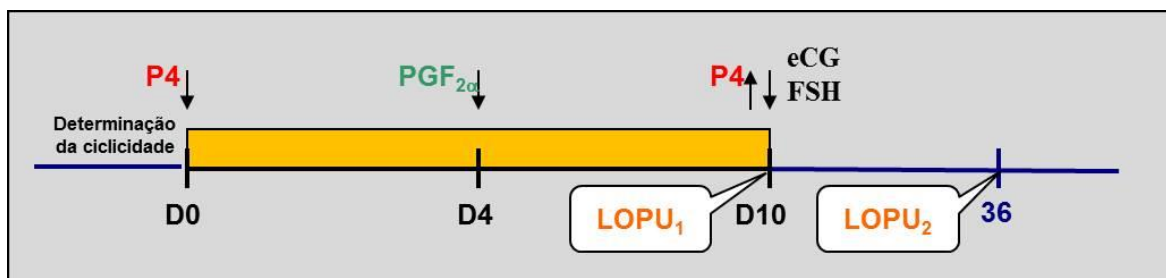


Figura 3 – Representação esquemática do Experimento 2, One Shot. LOPU₁= primeira aspiração folicular por laparoscopia, LOPU₂= segunda aspiração folicular por laparoscopia; D=dia; P4= acetato de medroxiprogesterona; PGF2α=cloprostenol; eCG=gonadotrofinas coriônica eqüina; FSH=hormônio foliculo estimulante; ↓ aplicação ou inserção; ↑ remoção..

b) Etapa II – (Experimento 2)

Com pelo menos 20 dias do término da Etapa I, os animais foram submetidos aos tratamentos anteriores (One Shot e DLOPU) seguindo-se um delineamento em quadrado Latino, onde os que receberam tratamento One Shot na Etapa I foram submetidos ao tratamento DLOPU e vice versa.

4.3 - Metodologias

Constatação da ciclicidade

Após um período de adaptação as ovelhas nos dois experimentos foram monitoradas ultrassonograficamente por um período de sete dias quanto à dinâmica de crescimento folicular e presença de corpo lúteo funcional. Adicionalmente duas amostras de plasma sanguíneo foram obtidas, no início e no final do período da monitoração (intervaladas de sete dias) para a quantificação de progesterona, a fim de se confirmar o status de ciclicidade ovariana.

Confirmação da funcionalidade do corpo lúteo

As amostras de sangue coletadas nos momentos acima descritos foram obtidas por venopunção jugular, em tubos a vácuo heparinizados, mantidos sob refrigeração até a centrifugação (1.200xg/10 minutos) com separação do plasma. O plasma foi mantido sob congelamento a 30°C negativos até o momento

quantificação hormonal. As dosagens plasmáticas de progesterona foram realizadas no “Laboratório de Endocrinologia” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária por radioimunoensaio (RIA), utilizando-se kits comerciais de elevada especificidade para progesterona em fase sólida (DPC MedLab) e contador gama automatizado (Vitek, mod Kinet Count 48, USA) que forneceram dados em ng/mL.

Valores de progesterona iguais ou superiores a 1ng/mL, em pelo menos uma das quantificações foram considerados indicativos de atividade luteal.

Acompanhamento ultrassonográfico da atividade ovariana

Após remoção das fezes da ampola retal e preenchimento total da mesma com solução aquosa de carboximetilcelulose, utilizando equipamento Aloka® Prosound 2 VET equipado com transdutor linear prostático de frequência 7,5 MHz (Modelo UST-660-7,5), realizou-se a identificação dos eventuais corpos lúteos (CL), como estrutura isogênica em relação ao estroma ovariano .

A onda de crescimento folicular foi caracterizada pela emergência de um ou mais folículos antrais, com crescimento de folículos entre 2mm a 6mm de diâmetro. Eventuais ovulações ocorreram no período de pré-tratamento, para estes casos o momento ovulatório foi considerado, aquele entre a última visualização do folículo pré-ovulatório, e seu desaparecimento, sendo que se confirmou o seu desaparecimento, no exame subsequente. (Figura 4)

No Experimento 1, após a LOPU os exames foram realizados a cada 8 horas, até completar um período de 72 horas, registrando-se o diâmetro e o ritmo de crescimento de todos os folículos detectáveis ultrassonograficamente que foram classificados como pequenos (< 2,5mm); médios (2,5 a 4,5mm) e grandes (>4,5mm).

Com base nos dados de crescimento e população de folículos médios em cada momento durante o período das 72 horas de observação, foi estabelecido o momento ideal (M1) para a realização da LOPU₂, no Tratamento 2 - DLOPU do Experimento 2.

Nas duas Etapas do Experimento 2, foram realizadas avaliações ultrassonográficas dos ovários no momento que antecedeu a LOPU final em ambos os tratamentos, a fim de se estabelecer uma previsibilidade do diâmetro e da quantidade dos folículos a serem aspirados. (Figura 4)

Ao termino dos exames, os animais recebiam alimentação concentrada para produzir estímulo positivo ao condicionamento.

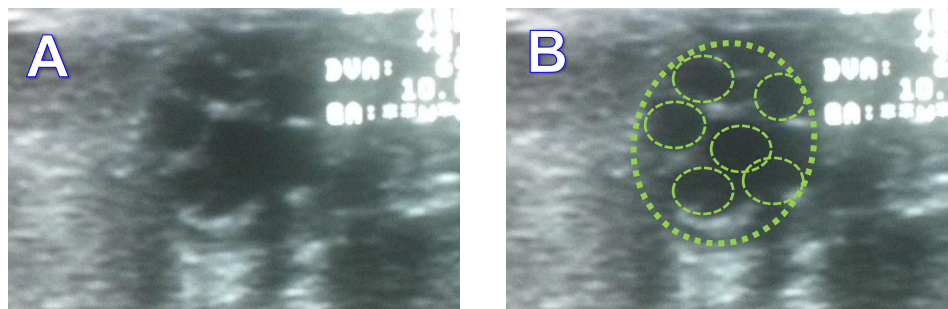


Figura 4 – (A) Sonograma de ovário submetido a protocolo superestimulatório em momento imediatamente antes a realização da LOPU; **(B)** Representação esquemática sobrepondo sonograma do ovário, e destacando a presença de múltiplos folículos.

Aplicação e remoção do pessário intravaginal

Após anti-sepsia da região peri-vulvar e vulva, com clorexidine degermante a 2%, e aplicação de spray antibiótico a base de terramicina e hidrocortisona (Terra-Cortril®) nos pessários intravaginais, afim de evitar o aparecimento de vaginites, realizando inserção com aplicador próprio.

Para remoção foi realizada nova antissepsia na região peri-vulvar e vulva e tracionado o pessário pelo seu cordão.

Aspiração folicular por Laparoscopia (LOPU)

Anteriormente a realização dos procedimentos foi feito um treinamento em ovários oriundos de matadouro, a fim de aperfeiçoar a técnica e padronização o sistemas de aspiração.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas, todos recebiam penicilina benzatina 30.000UI/kg antes do procedimento. Foi realizada a anestesia pela associação de cetamina 5,0mg/kg, com cloridrato

xilazina 0,2mg/kg, e anestesia peridural com 4mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor. No local de introdução do cateter foi realizado bloqueio regional com lidocaína 2% com vaso constritor.

As ovelhas foram contidas em maca apropriada para a realização da laparoscopia, em posição trendelenburg, com inclinação de 45 graus. Foi feita tricotomia na região abdominal e antissepsia com solução de clorexidina degermante a 2% e álcool. Na região paramediana retroumbilical esquerda foi então inserido um trocater (5mm) com válvula para insuflar a cavidade e criar o pneumoperitônio, com pressão variando de 5 a 8 mmHg, sendo em seguida introduzida a sonda por este trocater.

Foram inseridos na região paramediana retroumbilical direita mais dois trocateres de menor diâmetro para inserção das pinças atraumáticas, de manipulação do útero, ovários, tubas-uterinas e do sistema de aspiração. (Figura 5)

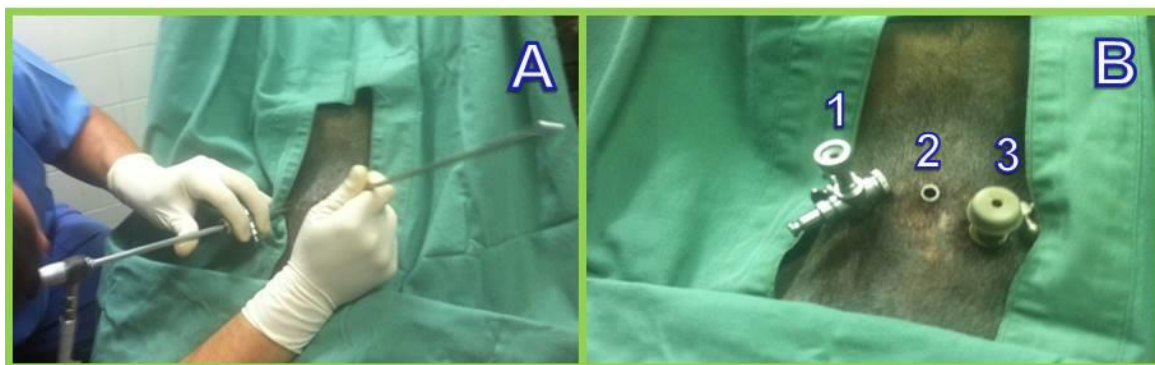


Figura 5 - (A) procedimento de laparoscopia para realização da LOPU; **(B)** Trocateres para realização da LOPU, 1 trocater para inserção da ótica, 2 e 3 trocateres para inserção da pinça de manipulações e sistema de aspiração.

Para realização das aspirações o sistema era constituído de Linha para aspiração folicular®, Rolha de alumínio para aspiração folicular®, Haste para aspiração folicular® e Agulha para Aspiração Folicular em Ovinos® (WTA - Tecnologia Aplicada), e a pressão de vácuo utilizada foi de 40mmHg gerada pela Bomba de Vácuo Digital BV 003d®(WTA - Tecnologia Aplicada). (Figura 6)

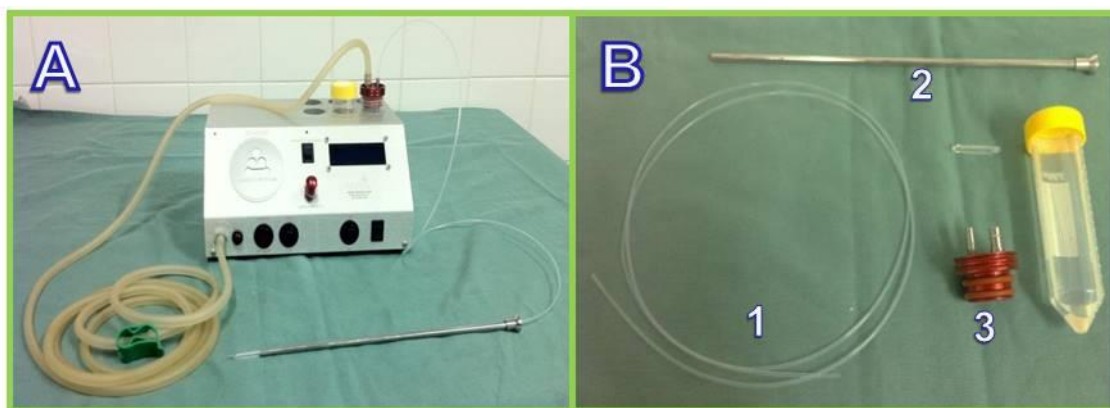


Figura 6 – (A) Bomba de vácuo digital; **(B)** 1-Linha para aspiração folicular, 2-Haste metálica para aspiração folicular, 3- Rolha de alumínio para aspiração folicular.

Uma bolsa contendo solução fisiológica heparinizada (1%), acoplada ao equipo e a uma bacia de inseminação, permitiu a irrigação do ovário, oviduto e útero durante o ato de aspiração e após seu término, removendo eventuais coágulos e fibrina sobre os órgãos, para melhor visualização das estruturas e prevenção da formação de aderências. (Figura 7- A)

No local de inserção dos trocâteres foi realizada sutura com fio de nylon 0, com ponto simples separado e aplicado spray de terramicina e hidrocortisona (Terracortril®). (Figura 7 - B)



Figura 7 – (A) Acesso ao abdômen para realização da irrigação das estruturas abdominais com solução fisiológica heparinizada (1%); **(B)** Sutura realizada nos locais de inserção dos trocâteres.

Complexos Cumulus Oophorus (COCs)

Após a realização da LOPU os COCs foram transferidos ao “Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA)” do Departamento de

Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu, para avaliação imediata, maturação *in vitro* (MIV) e avaliação após a MIV.

Avaliação Imediata dos COCs

Os COCs obtidos através da última LOPU nos dois tratamentos experimentais e em ambas as Etapas, foram avaliados imediatamente em estereomicroscópio (Olympus SZ51[®]) quanto as características do ooplasma e células do *cumulus* adaptado de Morton et al., (2005), seguindo a seguinte classificação:

- **Grau1** – mais que três camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granulado;
- **Grau 2** – duas a três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granulado;
- **Grau 3** – uma camada incompleta de células do *cumulus* ou poucas células do *cumulus*, e citoplasma homogêneo.
- **DED** – desnudos, expandidos e degenerados

Maturação oocitária in vitro (MIV) e Avaliação após MIV

Os COCs foram lavados em 5 gotas de meio TCM-199 tamponado com Hepes, durante o processo de avaliação, com finalidade de remover o debris celular. A seguir foram transferidos para gotas contendo 90 µL de meio de maturação contendo TCM-199 com sais de Earl acrescido de 0,1 UI/mL de FSH; 0,1 UI/mL de LH; 0,3mL de piruvato de sódio; 75 µg/mL de penicilina/estreptomicina; 10% de SFB; e 100 µM de cisteamina, mantidas em placas de petri (60 x 16mm), sob óleo mineral. Cultivados por 24 horas em estufa a 38,5°C e atmosfera com 5% de CO₂. Sendo que os classificados como DED não foram submetidos ao processo de cultivo para maturação (MIV).

a) Expansão das células do cumulus

Após 24 horas de cultivo os COCs foram avaliados em estereomicroscópio (Olympus SZ51[®]), quanto ao grau de expansão das células do *cumulus*, classificados 3 categorias:

- Expansão total das células do *cumulus*
- Expansão parcial do *cumulus*
- Ausência de expansão do *cumulus*

b) Maturação nuclear

Os COCs tiveram as células do *cumulus* removidas com auxílio de pipetas plásticas de 50 µL em meio TCM-199 Hepes, em seguida transferidos para gotas de 5 µL do corante bisbenzimidaz (Hoechst 33342), em lâmina histológica coberta com lamínula e examinados em microscópio Leica® DMIRB equipado com luz fluorescente ultravioleta (filtro 350 e 461nm, excitação e emissão, respectivamente), e classificados de acordo com a configuração cromossômica, e em diferentes estádios (LANDIM-ALVARENGA, 1999).

- **Vesícula germinativa (VG):** caracterizada pela presença de núcleo esférico e definido com carioteca íntegra e filamentos de cromatina descondensados;
- **Quebra da vesícula germinativa (QVG):** caracterizada pela cromatina condensada e ausência de membrana nuclear visível;
- **Metáfase I (MI):** em que os cromossomos estejam arranjados na placa metafásica e localizados periféricamente no ooplasma;
- **Metáfase II (MII)** caracterizado pela presença de cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, representado por um grupo denso de cromossomos.

Foram considerados maturados os COCs que atingiram o estágio de configuração nuclear condizente com quebra da vesícula germinativa.

Forma de análise de resultados

No Experimento 1 Foi utilizado um gráfico de dispersão com a linha de tendência da distribuição e estabelecida, quando possível, a equação que melhor definisse o fenômeno. Estabeleceu-se por meio do modelo teórico o ponto de maior concentração de folículos entre 2,5 e 4,5mm. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de comparações múltiplas de Dunn's, a 5% de probabilidade.

5 - Resultados

5.1 - Constatação da ciclicidade

Todas as ovelhas apresentaram atividade ovariana na avaliação ultrassonográfica, a partir da detecção de corpo lúteo ou de ovulação de folículo pré-ovulatório nos exames realizados no período pré-tratamento. Fato que se confirmou com a dosagem pareada de progesterona, onde todas as ovelhas apresentaram em pelo menos um dos momentos níveis séricos iguais ou superiores a 1 ng/mL.

5.2 - Avaliação do procedimento laparoscópico.

O protocolo anestésico permitiu perfeita manipulação dos animais para realização dos procedimentos, durante os quais as ovelhas permaneceram imóveis e relaxadas. Não ocorreram sinais clínicos, taquicardia ou taquipneia, que pudessem ser associados com dor ou desconforto. Nenhuma reação adversa foi detectada quanto ao protocolo anestésico.

Após o término dos procedimentos os animais apresentaram boa recuperação anestésica, ficando em posição quadrupedal, alguns minutos após o final das aspirações, e logo voltaram a se alimentar e ingerir água.

No local onde foram inseridos os trocateres foi visualizada boa cicatrização após uma semana, e nenhum animal apresentou sinais de rejeição aos pontos.

Não foi detectado qualquer sinal de aderência em ovários, tubas uterinas e útero, durante o procedimento em animais que já haviam sido submetidos ao procedimento de LOPU anteriormente.

5.3 Experimento 1

5.3.1 Determinação do momento ideal para a LOPU

O monitoramento ultrassonográfico do crescimento folicular após a realização da LOPU e tratamento superestimulatório, está representado na Tabela 1, e Gráfico 1, onde são apresentadas as populações de folículos

pequenos, médios e grandes de acordo com seus diâmetros ultrassonográficos ao longo do tempo de observação.

A menor população de folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$) foi observada a partir das 56 horas após a realização da LOPU. Já para a população de folículos médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) a maior população foi observada entre as 24 e 48 horas após a LOPU. A população de folículos grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$) manteve-se inalterada ao longo do período de observação.

A população de folículos médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) apresentou uma distribuição parabólica ao longo do período de observação, representada pela equação $y = -0,0071x^2 + 0,4908x - 2,2214$, tendo como ponto máximo 34,6 horas após a realização da LOPU ($X_v = -0,4908/[2 \cdot (-0,0071)]$). Com base nestas observações e para homogeneidade com o momento da LOPU no tratamento *One Shot*, determinou-se como momento ideal para a realização da DLOPU, 36 horas após a primeira aspiração folicular

Tabela 1 - Média $\pm$ dp da população de folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$), presentes á avaliação ultrassonográfica realizada a cada 8 horas, após LOPU e superestimulação ovariana em ovelhas.

Folículo	Horas após LOPU							
	8	16	24	32	40	48	56	64
Pequenos	5,6 ^a $\pm 1,5$	3,2 ^{ab} $\pm 1,1$	4,0 ^a $\pm 1,2$	1,0 ^{ab} $\pm 1,2$	1,0 ^{ab} $\pm 1,2$	1,4 ^{ab} $\pm 1,5$	0,8 ^b $\pm 1,3$	0,2 ^b $\pm 0,4$
Médios	1,6 ^{bc} $\pm 1,1$	3,4 ^{bc} $\pm 1,1$	4,6 ^{ab} $\pm 1,5$	7,0 ^a $\pm 1,7$	7,0 ^a $\pm 2,45$	4,8 ^{ab} $\pm 2,3$	1,6 ^{bc} $\pm 1,5$	0,8 ^c $\pm 0,8$
Grandes	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,2 $\pm 0,4$	0,6 $\pm 0,8$	0,4 $\pm 0,5$	2,0 $\pm 1,2$	1,4 $\pm 0,8$

Diferentes letras na mesma linha indicam números de folículos diferentes ($P < 0,05$)

$\varnothing$ = diâmetro do folículo

A partir de 56 horas foi encontrado no exame ultrassonográfico a presença de pequenas estruturas semelhantes a corpos lúteos em ovelhas.

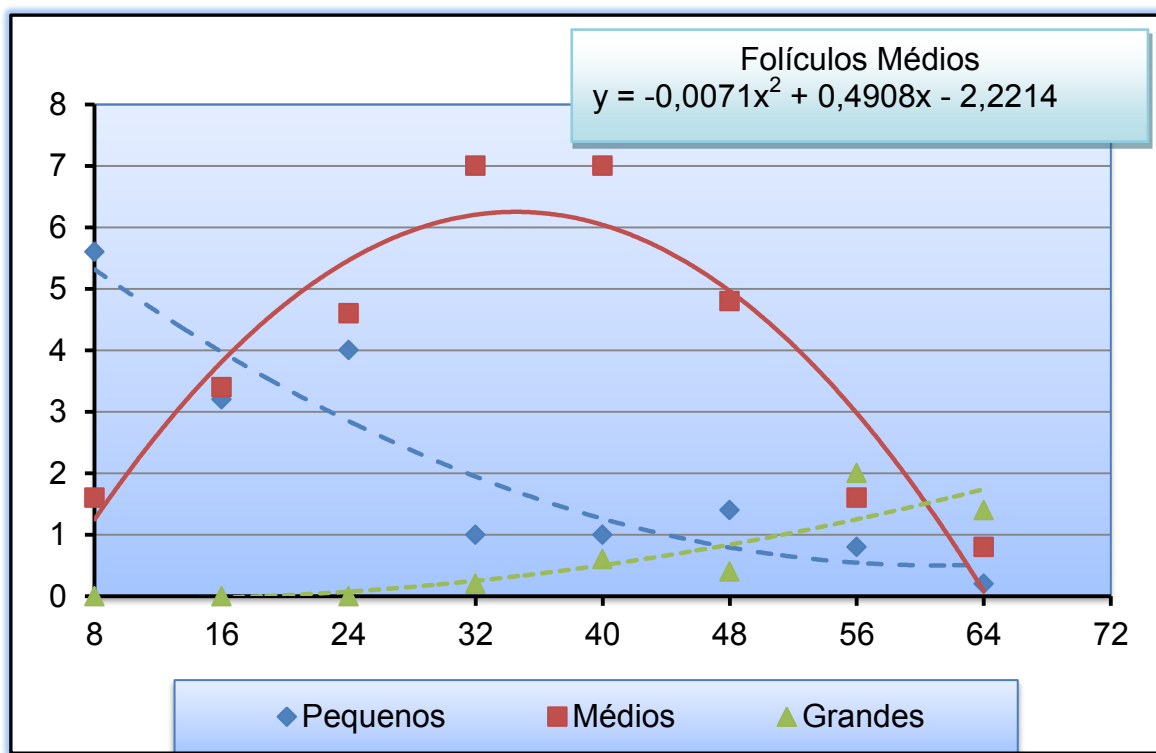


Gráfico 1. Linhas de tendência da população de folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ e $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$), presentes á avaliação ultrassonográfica realizada a cada 8 horas após LOPU e superestimulação ovariana em ovelhas.

5.4 Experimento 2

5.4.1 População folicular e COCs obtidos

O resultado dos exames ultrassonográfico realizado nas ovelhas, avaliando os folículos ovarianos quanto ao seu diâmetro, imediatamente antes da LOPU₂ está representado na Tabela 2.

Não houve diferença entre os ovários e nos dois tratamentos, *One Shot* e DLOPU quanto a media de folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$), sendo que em todos os animais ocorreu o predomínio de folículos médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$), e em menor número os folículos pequenos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$) não apresentaram diferença entre eles.

Tabela 2. Média $\pm$ dp da população de folículos ($\varnothing < 2,5\text{mm}$), médios ($\varnothing = 2,5$ e $4,5\text{mm}$) e grandes ($\varnothing > 4,5\text{mm}$) presentes nos ovários ao exame ultrassonográfico, imediatamente antes da LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento *One Shot* ou DLOPU.

	Folículos	Tratamento	
		<i>One Shot</i>	<i>DLOPU</i>
OVD	Pequeno	0,5 ^B $\pm 0,5$	0,1 ^B $\pm 0,3$
	Médio	3,7 ^A $\pm 0,3$	3,6 ^A $\pm 1,2$
	Grande	1,8 ^B $\pm 0,5$	0,3 ^B $\pm 0,4$
OVE	Pequeno	0,2 ^B $\pm 0,4$	0,17 ^B $\pm 0,4$
	Médio	4,0 ^A $\pm 1,9$	4,3 ^A $\pm 1,3$
	Grande	0,5 ^B $\pm 1,2$	0,2 ^B $\pm 0,4$
Total	Pequeno	0,7 ^B $\pm 0,7$	0,2 ^B $\pm 0,5$
	Médio	7,7 ^A $\pm 3,3$	7,9 ^A $\pm 1,9$
	Grande	0,8 ^B $\pm 1,5$	0,6 ^B $\pm 0,9$

Diferentes letras na mesma coluna indicam números de folículos diferentes ($P < 0,05$)

OVD= ovário direito, OVE= ovário esquerdo e $\varnothing$ = diâmetro do folículo

Na tabela 3. estão descritos os resultados do número de folículos presentes nos ovários imediatamente antes da LOPU, quantificados na avaliação ultrassonográfica, na visualização por laparoscopia, numero de COCs obtidos e a taxa de recuperação levando em conta os COCs obtidos em relação ao numero de folículos visualizados no procedimento laparoscópico. Não houve qualquer diferença estatística quando comparados os tratamentos.

Tanto no tratamento *One Shot* quanto no tratamento DLOPU o número de estruturas visualizadas no exame ultrassonografico foi semelhante ao visualizados in situ por laparoscopia.

O número de COCs obtidos foi menor que número de estruturas visualizadas por ultrassonografia ou laparoscopia nos dois tratamentos, sendo que a taxa de recuperação em ambos foi de 62,5 %.

Tabela 3. Média $\pm$ da população de folículos ovarianos presentes á avaliação ultrassonográfica imediatamente antes da LOPU, número de folículos aspirados e numero de oócitos obtidos, em ovelhas submetidas ao tratamento hormonal *One Shot* ou DLOPU e porcentagem da média oócitos recuperados em relação a média de folículos aspirados.

	Folículos			Recuperação %
	US	ASP	Obtidos	
One Shot	9,3 ^a $\pm 2,9$	7,7 ^a $\pm 2,6$	4,8 ^b $\pm 2,8$	62,5
DLOPU	8,7 ^a $\pm 2,0$	7,9 ^a $\pm 2,0$	4,5 ^b $\pm 1,6$	62,5

Diferentes letras na mesma linha indicam números de folículos diferentes (P<0,05)

US= folículos visualizados a ultrassonografia ASP= folículos aspirados e Ø = diâmetro do folículo

5.4.2 Avaliação imediata dos COCs obtidos.

Quando comparados os tratamentos *One Shot* e DLOPU quanto a qualidade imediata dos COCs obtidos, não houve diferença estatística entre eles, porém em ambos os tratamentos a quantidade de estruturas de Grau 2 fora diferentes da média de estrutura classificadas como DED. Apenas no tratamento DLOPU foi encontrada diferença estatística entre estruturas Grau 1 e DED. Nos dois tratamentos a média de Grau 3 e DED não obteve diferença estatística. (Tabela 4)

A média de folículos que foram submetidos ao processo de maturação, incluindo apenas estruturas Grau 1, Grau 2 e Grau 3 foi de 4,5, igual tanto para os submetidos ao *One Shot* quanto a DLOPU.

5.4.2 Avaliações pós cultivo por 24 horas

O Resultado da avaliação dos COCs após o processo de MIV, referentes a expansão das células do cumulus, estão representadas na Tabela 5. Mostrando que não ocorreu diferença entre os tratamentos quanto a expansão total, parcial ou ausente são comparadas entre elas.

No tratamento DLOPU a expansão total das células foi diferente quando comparada da ausência de expansão das células, comparada a expansão parcial ela não apresentou diferença, bem como também não diferiram expansão parcial e ausente entre estas.

Já no protocolo One Shot não apresentou diferença entre a média de estruturas com expansão total e ausência, nem entre expansão total quando comparado a expansão parcial. Porém existe diferença estatística entre os COCs que alcançaram expansão parcial e ausente.

Tabela 4. Média $\pm$ dp do numero de oócitos obtidos após LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento *One Shot* ou DLOPU. Avaliados em relação a qualidade dos *cumulus oophurus* COCs, divididos em viáveis (Grau 1, Grau 2, e Grau 3) e não viáveis (desnudos, expandidos e degenerados-DED).

Classificação Imediata dos COCs				
	Grau 1	Grau 2	Grau 3	DED
<i>One Shot</i>	1,7 ^{ab}	2,3 ^a	0,4 ^{ab}	0,3 ^b
	$\pm 2,34$	$\pm 1,5$	$\pm 0,9$	$\pm 0,88$
	4,5			
		$\pm 3,2$		
DLOPU	1,9 ^{ab}	2,3 ^a	0 ^{bc}	0 ^c
	$\pm 1,6$	$\pm 1,8$	$\pm 0,6$	$\pm 0,0$
	4,5			
		$\pm 1,6$		

Diferentes letras na mesma linha indicam números de estruturas diferentes ($P < 0,05$)

Tabela 5. Média, $\pm$ dp e porcentagem do número de COCs obtidos por LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento *One Shot*, avaliados quanto a expansão das células do cúmulo após 24 horas de MIV, divididos em expansão total, parcial e ausente.

Expansão da cél do <i>Cumulus</i>					TOTAL
		Total	Parcial	Ausente	
<i>One Shot</i>	Nº	1,9 ^{ab}	2,4 ^a	0,2 ^b	4,5 ^A
		$\pm 2,4$	$\pm 1,4$	$\pm 0,4$	$\pm 3,2$
	%	40,0	50,0	10,0	100,0
DLOPU	Nº	2,3 ^a	1,8 ^{ab}	0,3 ^b	4,5 ^A
		$\pm 1,9$	$\pm 0,4$	$\pm 0,7$	$\pm 1,6$
	%	50,0	40,0	10,0	100,0

Diferentes letras minúsculas na mesma linha ou maiúsculas na mesma coluna indicam números diferentes números de estruturas $P < 0,05$)

O dados referentes as avaliações da maturação nuclear dos oócitos levados ao processo de MIV estão expressos na Tabela 6. Nos dois grupos houve diferença quando comparado MII em relação as outros estadios de desenvolvimento, MI e QVG e também em relação a estruturas maturadas e não maturadas, porém quando comparados os mesmos estadios e desenvolvimento entre os grupos não houve diferença estatística

Tabela 6. Médias, $\pm$, dp e porcentagens do numero de COCs obtidos após LOPU de ovelhas submetidas ao tratamento *One Shot* ou DLOPU, avaliados quanto a maturação nuclear, após 24 horas de MIV, divididos em viáveis (MII, MI, QVG) e não viáveis (VG e DEG).

		Maturados			Não maturados		
		MII	MI	QVG	VG	DEG	Não id
One Shot	Média	3,4 ^a $\pm 3,2$	0,4 ^b $\pm 1,2$	0,2 ^b $\pm 0,4$	0,3 ^b $\pm 0,9$	0,2 ^b $\pm 0,9$	0,1 $\pm 0,3$
	%	73,0	29,0	4,0	7,0	5,0	13,0
DLOPU	Média	3,6 ^a $\pm 1,31$	0,5 ^b $\pm 0,8$	0,0 ^b $\pm 0,0$	0,0 ^b ± 0	0,3 ^b $\pm 0,49$	0,0 ^b ± 0
	%	81,0	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Diferentes letras na mesma linha indicam números de estruturas diferentes (P<0,05)

MII=metáfase II , MI= metáfase I, QVG= quebra da vesícula germinativa, VG= vesícula germinativa, DEG= degenerados e id=identificados

6 – Discussão

6.1 - Constatação da ciclicidade

A presença de corpo lúteo e ou a ovulação de folículos pré ovulatório detectados em todos os animais durante as avaliações ultrassonográficas realizadas nos períodos de pré tratamento indicam que todas as ovelhas utilizadas em ambos os experimentos se encontravam em plena atividade reprodutiva.

Fato que se confirmou com a dosagem de progesterona sérica, que detectou níveis deste hormônio maior ou igual a 1ng/mL em pelo menos uma das amostras que foram obtidas de forma pareada com intervalo de 7 dias durante o mesmo período, pois esses níveis foram detectados apenas em ovelhas clicando, entre terceiro e decimo quinto dia do ciclo estral de fêmeas desta espécie (SHABANKAREH et al., 2008)

Ao somar esses dois fatores pode-se excluir qualquer inferência da estacionalidade reprodutiva nos resultados obtidos em reposta aos tratamentos

superestimulatórios utilizados, sendo que todos os animais se encontravam em atividade reprodutiva normal.

6.2 - Procedimento laparoscópico.

A não visualização de alterações dos parâmetros, frequência respiratória e frequência cardíaca, indicam que os animais não sofreram qualquer tipo de desconforto durante os procedimentos laparoscópicos, mostrando que a analgesia oferecida em especial pelo bloqueio peridural e protocolo anestésico foi adequado não somente oferecendo contenção dos animais mas também analgesia, dessa forma respeitando questões relacionadas ao bem estar animal.

Ao observar que as ovelhas alguns minutos após o tratamento assumiram posição quadrupedal e se alimentaram significando que não ocorreu sensibilidade dolorosa excessiva associada aos procedimentos.

A não visualização de aderências durante procedimentos laparoscópicos em animais que já haviam sido submetidos ao procedimento de LOPU dentro dos experimentos, indicam que aspirações sequenciais, realizadas de maneira semelhantes a descrita no materiais e métodos desta dissertação não causam alterações permanentes na anatomia funcional do aparelho reprodutivo.

Assim sendo, quando comparada a procedimentos mais invasivos, utilizados em biotecnias da reprodução, visando maximizar a atividade reprodutiva, como a coleta de embriões cirúrgica que tende após repetições levar a aderências ovarianas, tuba uterina e no útero (STANGL et al, 1999)

6.3 Momento ideal para a LOPU

O momento ideal para a LOPU₂ realizada no tratamento DLOPU foi determinada após avaliação dos dados obtidos nas avaliações ultrassonográficas no Experimento I. A distribuição parábola visualizada através da linha de uma tendência demonstrou que a maior concentração de folículos médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5\text{mm}$) estava presentes 34,6 horas após a realização da LOPU₁ e tratamento superestimulatório.

Contudo por não haver diferença estatística na concentração de folículos no intervalo de 24 e 48 horas, após mesmo procedimento, foi fixado momento da LOPU₂ 36 horas, seguindo o melhor momento para aspiração, descrito por Baldassarre (1996), in *insto posto* não diferindo do momento de realização da LOPU do tratamento *One Shot*. Demonstrando assim, que a realização de uma LOPU imediatamente antes do tratamento superestimulatório não alterou a resposta ovariana a estimulação hormonal quanto ao momento que confere melhores condições para obtenção dos oócitos.

6.4 População folicular e COCs obtidos

Os tratamentos superestimulatórios agem de forma uniforme nos ovários direito e esquerdo sendo que não apresentaram diferença entre as populações foliculares nas avaliações ultrassonográficas imediatamente antes da LOPU na gônada direita e esquerda.

A realização da LOPU₁ visando a ablação de todos os folículos imediatamente antes do tratamento superestimulatório, não levou a um aumento da a população de folículos na avaliação ultrassonográfica anterior a LOPU₂. Diferente do que era esperado quando comparado ao descrito por KIM e colaboradores (2001), onde em bovinos a remoção mecânica de folículos maiores que 5mm levou a emergência de uma nova onda folicular e esses folículos foram mais responsáveis a ação do FSH.

A realização de um procedimento de LOPU (LOPU₁) com intervalo de 36 horas a outra LOPU (LOPU₂), não interfere negativamente quanto a respostas ao tratamento hormonal, quando comparada ao tratamento *One Shot*, sendo que assim pode permitir uma maior obtenção de COCs em um mesmo intervalo de tempo, pela realização de uma LOPU a mais.

A avaliação ultrassonográfica anterior ao procedimento foi eficiente para prever a população folicular ovariana, pois quando comparada ao número de folículos aspirados não foi verificada diferença entre as médias. Assim a realização da ultrassonografia se mostrou uma técnica eficiente para avaliar a resposta ovariana a superestimulação, podendo assim auxiliar ao técnico quanto à aspiração

de todas as estruturas, diminuindo assim a chance de deixar algum folículo sem ser aspirado, podendo dessa maneira melhorar as taxas de recuperação.

A taxa de recuperação dos dois tratamentos foi de 62,5 %, foi menor que a descrita por Baldassarre (1996), onde obteve cerca de 80% de recuperação. Porém como não obteve-se diferença entre o numero de COCs obtidos quando comparado o tratamento *One Shot* e DLOPU, mostrou que a aspiração visando a ablação de todos os folículos não levou a prejuízos quanto a recuperação das estruturas.

6.5 - Avaliação imediata COCs

A média de COCs classificados como, Grau 1, Grau 2 e Grau 3 foi de 4,5 estruturas em ambos os tratamentos, demonstrando a qualidade de estruturas obtidas utilizando o DLOPU e que não foi alterada pela ablação de todos os folículos.

Esse tratamento não apresentou nenhuma estrutura classificada como DED, já em *One Shot*, foram encontradas algumas estruturas DED, pois a ablação previa foi ideal para remoção de folículos mais antigos, dos quais provavelmente originaram tais estruturas, ou seja como não foram submetidas ao processo de MIV, podemos entender que com tratamento DLOPU obtiveram um melhor aproveitamento das estruturas, onde todas foram levadas ao processo de MIV.

Ainda foi notado uma maior homogeneidade no tratamento DLOPU, pois o desvio padrão do total de estruturas Grau1, Grau 2 e Grau 3, foi menor quando comparado ao *One Shot*.

6.6 - Avaliações pós cultivo por 24 horas

Quando avaliados quanto à expansão das células do *cumulus*, o tratamento DLOPU apresentou um número maior de estruturas com expansão total do que estruturas com ausência de expansão, quando no tratamento *One Shot*, não foi encontrada diferença entre expansão total e parcial, demonstrando que a ablação de folículos visíveis presentes no ovário imediatamente antes do

tratamento superestimulatórios pode levar a obtenção de estruturas com maior capacidade de expansão das células do *cumulus*.

Não houve diferença nas avaliações quanto a maturação nuclear entre os tratamentos, porém o tratamento DLOPU apresentou maior homogeneidade quanto ao número de estruturas consideradas maturadas, demonstrado por um menor desvio padrão quando comparado ao tratamento One Shot.

Apesar de não visualizada diferença estatística em todas as avaliações estatísticas o tratamento DLOPU sempre apresenta uma tendência de superioridade neste aspecto.

6.7 - Tratamento DLOPU

Um fator que não foi avaliado neste experimento, mas que deve ser considerado relacionado a quantidade de COCs obtidos é em relação a LOPU₁, visto que esta aspiração previa pode ser utilizada também com a finalidade de obtenção de estruturas.

Tendo em vista que diversos tratamentos que visam controlar a população folicular, suprimindo a presença de folículos grandes(> 5mm), como a utilização de agonistas e antagonistas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (BREBION et al., 1992; COGNIE, 1992), estradiol-17 β associado a progestágenos (MEIKLE et al., 2001; UNGERFELD et al., 2004) entre outros administração. Protocolos hormonais utilizando a dupla aspiração podem conferir um número maior de COCs por ovelha em um menor espaço de tempo, além de uma tendência a uma maior qualidade das estruturas obtidas na LOPU₂.

7 - Conclusões

Os resultados obtidos em ambos os experimentos nos permitiram inferir que as aspirações de todos os folículos ovarianos realizadas concomitante a protocolo superestimulatório:

- A resposta ovariana quanto ao tempo de apresentação do maior número de folículos médios na avaliação ultrassonográfica foi de 34,6 Horas.

- Pode levar a formação de corpos lúteos cerca de 56 horas após sua realização.

- Apresenta uma maior homogeneidade na qualidade de dos COCs obtidos.

- Não reduz a capacidade de expansão de células do *cumulus* e nem a capacidade de maturação nuclear.

- A Ultrassonografia foi um método preciso de quantificação de folículos ovarianos passíveis de serem avaliados

- São necessários mais estudos para aperfeiçoar novos tratamentos que utilizem a aspiração sequencial como o DLOPU.

8 – Bibliografia

ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103 – 1113, 1994.

ALI, A.; LANGE, A.; GILLES, M.; GLATZEL, P.S. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. **Theriogenology**, v.56, p.569–576, 2001.

ARENDT, J. Mielatnin and the mammalian pineal gland. **London Chapman & Hall**, p. 331. 1995

ARMSTRONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryoproduction from calf oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.7, p.1227-1236, 1994.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.9, n.3, p.333-339, 1997.

BAIRD D. T.; CAMPBELL B. K.; MANN G. E.; McNEILLY A. S. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility** . v.43, p.125-138, 1991.

BALDASSARRE, H.; DEMATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; CASTRO, T.E.; CABRERA FISCHER, E.I. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Theriogenology**; v. 35, p.145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; DEMATOS, D.G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocytes donors. **Theriogenology**; v. 45, p.707-717, 1996.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production reproduction technologies. **Theriogenology**; v. 57, p.275-284, 2002.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUA, Y.F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.56, p.831–839, 2003.

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

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

BELCHETZ, P.E.; PLANT, T.M.; NAKAI, Y.; KEOGH, E.J. AND KNOBIL, E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science**. v. 202 p. 631-633, 1978.

BERGFELT, D.R.; LIGHFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology** , v.42, p.895-907, 1994.

BERTSCHINGER, H.J.; ASA, C.S.; CALLE, P.P.; LONG, J.A.; BAUMAN, K.; DEMATTEO, K.; JÖCHLE, W.; TRIGG, T.E.; Human, A. A. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue

acetato de deslorelina: preliminary observations. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.57, p. 275-283, 2001.

BICUDO, S. D. **Sistemas de acasalamento em ovinos: monta natural e inseminação artificial**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista-UNESP, 2005. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman1.htm>. Acesso em: 15 maio. 2013.

BÓ, G.A.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, v.36, p.169- 183, 1991.

BÓ, G.A.; BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.T.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Anim. Reprod.Sci.**, v. 59, p. 141-157, 2000.

BREBION, P.; COGNIE, Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. In: 5th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, França, 1989. **Proceedings of 5th Meeting on European Embryo Transfer Association** , Lyon, França, 1989, p.106.

BREBION, P., BARIL, G., COGNIE, Y., VALLET, J. C. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. **Ann Zootech**; v. 41, p.331-9,1992.

BREVINI-GANDOLFI , T.A.; FAVETA, L.A.; MAURI, L.; LUCIANO, A.M.; CILLO, F.; GANDOLFI, F. Changes in poly (A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.52, p. 427-233, 1999.

CALLESEN, H.; GREVE, R.; CHRISTENSON, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology** , v.27, p.217, 1987. (Abstract)

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

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

CONN, P.M., CROWLEY W.F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. **N Engl J Med**. V. 324, p. 93-103, 1991.

CONN, P.M., HUCKLE, W.R., ANDREWZ, W.V., MCARDLE C.A. The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. **Recent Prog Horm Res**. v. 43,p. 29-68, 1987.

COY, D.H.; SCHALLY, A.V. Gonadotrophin releasing hormone analogues. **Annual Clinical Research**, v.10, p.139–144, 1978.

CROWLEY, W.F. JR., FILICORI, M., SPRATT, DI., SANTORO, N.F. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. **Recent Prog Horm Res** . v. 41,p. 473-531, 1985

CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; GUSZKIEWICZ, A.; KOSSAKOWSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lamb after in vitro maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Mol. Rep. Dev.**, v. 30, p. 34-38, 1991

D'OCCHIO, M.J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T.R.; ASPDEN, W.J.; TRIGG, T.E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 433–442, 2000.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamic in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p.1211-1239, 2001.

DUFOUR, J.J.; COGNIÉ, Y.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.C.; ROMAIN, R.F. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal Reproduction Fertility**, v.118: p.85-94, 2000.

EPPIG, J.J.Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturatio in eutherian mammals. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p.485-489, 1996.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; ZAMBRINI, F. N.; VIANA, J. H. M.; AMORIM, L. S.; CAMARGO, L. S. A. Superovulação de cabras utilizando a primeira onda follicular do ciclo estral. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, supl. 1, p. s509, 2006. Edição dos resumos da 20. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá, MG, agosto 2006.

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

GÖKDAL, Ö.; ATAY, O.; ULKER, H.; YARALI, E.; HELVA, I.B.; DEAVILA, D.M.; REEVES, J.J. GnRH or eCG treatment fails to restore reproductive function in GnRH immunized ewes. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.1-13, 2009.

GONZÁLEZ-BULNES, A. SANTIAGO-MORENO J.; COCERO, M.J.; SOUZA, C.J.; GROOME, N.P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D.T.

Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology** 57, 1263–1272. 2002.

GORDON, I. **Controlled Reproduction in Sheep and Goats**. New York CABInternational, 1997, 450p.

GRAFF, K.J., MEINTJES, M., DYER, V.W., PAUL, J.B., DENNISTON, R.S., ZIOMEK, C.A., GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v. 51, p. 1099–1119, 1999

GÜNGÖR, O.; PANCARCI, S.M.; ÇENESİZ M.; BECERİKLİSOY, H.B.; KANCA H. Effect of GnRH implant (deslorelin) with different formulation on fertility and delay of oestrous cycle in ewes. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. v.51, p.25-29, 2007.

HAFEZ, B. E HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals** 7.ed. Lippincott Williams & Wilkins – USA – p.177-178. 2000

HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**. v.33, p. 519– 5299, 1992.

HAZUM, E., CONN, P.M. molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The GnRH receptor. **Endocr Rev**. v. 9, p. 379-386, 1988.

HUDSON, N. O'CONNELL, A.R.; SHAW, L.; CLARKE, I.J.; MCNATTY, K.P. Effect of exogenous FSH on ovulation rate in homozygous carriers or noncarriers of the booroola FecB gene after hypothalamic-pituitary disconnection or after treatment with a GnRH agonist. **Domestic Animal Endocrinology**, v.16, n.1, p.69-80, 1999.

IBGE. **Censo agropecuário 2006, resultados preliminares**: Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>> Acesso em: 12 de agosto de 2012.

KARSCH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P.; MOENTER, S.M. Gonadotropin- releasing hormone requirements for ovulation. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 303-309, 1997.

KARSCH, F.J.; DAHL, G.E.; EVANS, N.P.; MANNING, J.M.; MAYFIELD, K.P.; MOENTER, S.M.; FOSTER, D.L. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol, **Biol. Reprod**, v.49, p. 1377–1383, 1999.

KIM, H.I., SON, D.S., YEON, H., CHOI, S.H., PARK, S.B., RYU, I.S., SUH, G.H., LEE, D.W., LEE, C.S., LEE, H.J., YOON, J.T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v.55, p.937-945, 2001

KNOBIL, E. On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. **Recent Prog Horm Res.** v. 30, p.1-46, 1974.

KO, J.C.; KASTELIC, J.P.; DEL CAMPO, M.R.; GINTHER, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **J. Reprod. Fertil**, v.91, p.511-519, 1991.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Produção in vitro de embriões eqüinos: avanços e limitações. **Arq Fac Vet**, UFRGS v. 27, n.1, p. 54. 1999

LEYVA V.; BUCKRELL B. C.; WALTON J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology** 50:395-416, 1999.

LÓPEZ-ALONSO, C. ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; COCERO, M.J.; ROS, J.M.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single shortacting dose of GnRH antagonist. **Theriogenology** 64, 1833–1843. 2005.

LUNDY, T., SMITH, P., O'CONNELL, A., HUDSON, N. L., AND MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of sheep. **J. Reprod. Fertil.** 115, 251–262, 1999

LUTHER, J.S.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; KIRSCH, J.D.; WEIGL, R.M.; KRAFT, K.C.; NAVANUKRAW, C.; PANT, D.; REYNOLDS, L.P.; REDMER D.A. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. **Small Ruminant Research**, v.72, p.227-231, 2007

MARTEMUCCI, G. & D'ALESSANDRO, A.G. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGf2 α and estradiol benzoate treatments. **Small Rum. Res.**, v.93, p.41-47, 2010.

MCNEILLY, A.S. & FRASER, H.M. Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. **Journal of Endocrinology**, v.115, p.273-282, 1987.

MCNEILLY, A. S. Neuroendocrine changes and fertility in breast-feeding women. **Prog. Brain Res**, v.133, p.207–14, 2001.

MEIKLE, A.S.; FORSBERG, E.G.; GARÓFALO, E.G.; CARLSSON, M.A.; LUNDEHEIM, N.; RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 β . **Anim. Reprod. Sci.**, v. 67, p. 79-90, 2001.

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

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl 54, p.449-460, 1999.

MUNSON, L.; BAUMAN, J.E.; ASA, C.S.; JÖCHLE, W.; TRIGG, T.E. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 269-273, 2001.

PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Reproductive responses of early postpartum dairy cattle to continuous treatment with a GnRH agonist (deslorelin) for 28 days to delay resumption of ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 70-23, 2002.

PICTON, M.; TSONIS, C.G.; MCNEILLY, A.S. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. **Journal Endocrinology**, v.126, p.297-307, 1990.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, p.1, 1988.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, Th.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.35, p.857-862, 1991.

PTAK, G.; LOI, P.; DATTENA, M.; TISCHNER, M.; CAPPAL, P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. **Biol Reprod**; v. 61, p. 1568-1574, 1999

RAVINDRA, J.P.; RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; ADAMS, J.P. Ultrasonic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 101, p. 501-509, 1994.

ROMAGNOLI, S.; Stelletta, C.; Milani, C.; Gelli, D.; Falomo, M.E.; Mollo, A. Clinical Use of Deslorelin for the Control of Reproduction in the Bitch. **Reprod. Dom. Anim.**, v.44, n. 2, p.36–39, 2009

RUBIANES, E. Nocións básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: **Controle Farmacológico Do Ciclo Estral Em Ruminantes**. São Paulo. p. 255-282, 2000.

SANTEN, R.J., PAULSEN, C.A. Hypogonadotropic eunuchoidism. I. Clinical study of the mode of inheritance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 26, p. 47-54, 1973.

SANTOS, V.C.; Ezequiel J.M.B.; Oliveira, P.S.N.; Galati, R.L.; Barbosa, J.C. Consumo e digestibilidade em ovinos alimentados com grãos e subprodutos da canola. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.1, p.96-105, 2009

SAWYER, H. R., SMITH, P., HEATH, D. A., JUENGEL, J. L., WAKEFIELD, ST. J., MCNATTY, K. P.. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biol. Reprod.** 66, 1134–1150, 2002

SCARAMUZZI, R. J. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants Reproduction, **Fertility and Development**, v. 23, p. 444–467, 2011.

SHABANKAREH, K. H.; HABIBIZAD, J.; TUYKY, M. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. **Animal Rep. Sci.**, v114, p-362-369, 2008.

SNYDER, D.A.; DUKELOW, R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnoses, and follicle aspiration in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.2, p.143-148, 1974.

SOUZA, C. J.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the oestrous cycle. **Biol. Reprod.** v. 56, p. 483–488, 1997.

STANGL, M.; KUHHLER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick up in sheep. **Theriogenology**; v. 521, p. 709-716, 1999.

TAKADA, L. Bicudo, S.D.; Rodrigues, C.F. C.; Lenz, F. F.; Bianchini, D.; . Avaliação dos momentos de início de estro e da ovulação em ovelhas sulffolk submetidas a protocolo de curta duração para a sincronização do estro na pré-estação reprodutiva. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.475-477, 2003.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça suffolk.** Tese (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004

TERVIT, H. R., SMITH, J. F., MCGOWAN, L. T., WELLS, R. W., PARR, J. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. **Proc Aust Soc Reprod Biol**; v.24, p.26 abstr.,1992.

TERVIT, H. R., SMITH, J. F., MCGOWAN, L. T., PUGH, P. A. Birth of lambs from embryos produced in vitro following laparoscopic recovery of follicular oocytes. **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.**; v.27, p.68, 1995.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.4, p.26, 2006.

TRIGG, T. E.; WRIGHT, P. J.; ARMOUR, A. F. et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. **J. Reprod. Fert.**, Suppl. 57, p. 255-261, 2001.

ULLOA-AGUIRRE, A., TIMOSSI, C. Biochemical and functional aspects of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropins. **RBM Online**. v. 1, p.48-62, 2000.

UNGERFELD, R.; DAGO, A. L.; RUBIANES, E.; FORSBERG, M. Response of anestrus ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17 β . **Reprod. Nutr. Dev.** 44, 89–98, 2004.

VIÑALES C, BANCHERO G, RUBIANES E. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. **Theriogenology** 51:437, 1999.

WANI N.A.,. *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Rum. Res.**, v. 44, p. 89-95, 2002

WEBB, R.; Baxter, G.; McBride, D.; Ritchie, M.; Springbett, A.J. Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. **J. Reprod. Fert.** 94, 143–151, 1992.

WRIGHT, P. J.; VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; et al. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. **J. Reprod. Fert.**, v. 57, p. 263-268, 2001.

9 Trabalho científico

“Trabalho enviado para a revista Ciencia Rural - Universidade Federal de Santa Maria”

Dinâmica folicular em ovelhas submetidas à superestimulação após ablação dos folículos ovarianos por LOPU.

Follicular dynamics in sheep subjected to superstimulation after ablation of ovarian follicles by LOPU.

Renan Denadai, Hyago Ramalho Leite, Luana de Cássia Bicudo, Leandro Rodello, Eunice Oba, Sony Dimas Bicudo.

RESUMO

Com objetivo de estudar a o efeito da aspiração por laparoscopia de todos os folículos ovarianos visíveis previamente a realização de tratamento superestimulatório em ovinos, após a confirmação da ciclicidade por avaliação ultrassonográfica e dosagem de progesterona, foi colocado pessário vaginal de acetato de medroxiprogesterona em 5 ovelhas adultas, sem raça definida, durante 10 dias, no quarto dia foi administrado 100µg cloprostenol sódico, no décimo dia foi aplicado 300UI eCG associado a 80mg FSH e realizada a remoção do pessário e aspiração de todos os folículos ovarianos visíveis, guiada por laparoscopia. Após o tratamento a cada 8 horas foi realizada avaliação ultrassonográfica das estruturas ovarianas por um período de 64 horas, onde o número e o diâmetro de folículos pequenos (< 2,5 mm); médios (2,5 a 4,5mm) e grandes (>4,5mm) foram contabilizados. O número de folículos pequenos que inicialmente apresentava média $5,6 \pm 1,5$, só se alterou a partir de 56 horas ($0,8 \pm 1,3$), folículos grandes somente foram vistos a partir de 32 horas, $0,2 \pm 0,4$; a população de folículos médios, durante o período de observação, apresentou um distribuição parabólica, onde o seu vértice, considerado o ponto teórico de maior concentração foi as 34,6 horas, não ocorrendo diferença ($P > 0,05$) entre 24

($4,6 \pm 1,5$) e 48 horas ($4,8 \pm 2,3$). Concluimos que em ovelhas submetidas à superestimulação ovariana após remoção de todos os folículos visíveis à laparoscopia, o desenvolvimento folicular é caracterizado pela emergência de nova onda de crescimento, com predomínio de folículos médios entre 24 e 48 horas sendo o ponto teórico de maior ocorrência às 34,6 horas.

Palavras chave: dinâmica folicular, superestimulação, ultrassom, ovelhas

ABSTRACT

Aiming studying the effect of laparoscopic aspiration of all visible follicles previously performing superestimulatory treatment in sheep, after confirmation of cyclicity by ultrasonography and progesterone levels, vaginal pessary of medroxyprogesterone acetate was placed in 5 adult sheep undefined breed for 10 days, on the fourth day was administered 100µg sodium cloprostenol on the tenth day was applied 300UI eCG associated with 80mg FSH and performed the removal of the pessary and aspiration of all visible follicles, guided by laparoscopy. After treatment every 8 hours was performed ultrasonographic assessment of ovarian structures for a period of 64 hours, where the number and diameter of small follicles (<2.5 mm); medium (2.5 to 4.5 mm) and large (> 4.5 mm) were recorded. The number of small follicles that initially had an average 5.6 ± 1.5 , only changed from 56 hours (0.8 ± 1.3), large follicles were seen only from 32 hours, ± 0.2 0.4; the population of medium follicles during the observation period, presented a parabolic distribution, where its apex, considered the theoretical point of highest concentration was the 34.6 hours, no difference ($P > 0.05$) 24 (4.6 ± 1.5) and 48 hours (4.8 ± 2.3). We concluded that in ewes submitted to ovarian superstimulation after removal of all visible follicles will laparoscopy, follicular development is characterized by the emergence of new wave of growth, with a predominance of medium follicles between 24 and 48 hours and the theoretical point of greatest occurrence for 34.6 hours.

Keywords: follicular dynamics, superstimulation, ultrasound, Ewes,

INTRODUÇÃO

Diversos fatores como, idade dos animais (ARMSTRONG, 2001), técnicas de aspiração, diâmetro do folículo (COGNIÉ et al., 1996, 1998; KHATIRA et al., 2007) e do oócito (DURINZI et al., 1995), presença de corpo lúteo (WANIA et al., 1999) e tratamento superestimulatório (BALDASSARRE et al. 1996, 2002), podem influenciar a taxa de recuperação e a qualidade dos *complexos cumulus oophorus* (COC's) obtidos e o desempenho da maturação oocitária bem como taxa de produção *in vitro* de blastocistos.

Em ovinos, folículos maiores do que 3mm apresentam melhores taxas de recuperação e seus oócitos resultam em melhores taxas de aproveitamento em programas de produção de embriões *in vitro* (COGNIÉ et al., 1998). Entretanto, folículos grandes, apesar de serem mais facilmente visualizados, podem apresentar piores taxas de recuperação atribuindo-se isso à maior viscosidade de seu conteúdo (BALDASSARE et al. 1994a; SENEDA et al, 2001).

Baldassare et al. (1994b) obtiveram melhores taxas de recuperação em folículos maiores que 3mm (83,8%) quando comparados folículos menores que 3 mm (63,4%). Rodriguez e colaboradores em 2006 obtiveram maior proporção de complexos oócitos/células do cúmulo (COCs) de boa qualidade a partir da aspiração de folículos com diâmetro entre 3 e 5mm, utilizando pressões de vácuo em torno de 10mL H₂O/min.

O emprego da superestimulação ovariana em ovelhas previamente à aspiração é de extrema importância para a elevação dos índices de recuperação oocitária bem como para a obtenção de COC's de melhor qualidade e com maior quantidade de células (BALDASSARRE et al., 1996; COGNIÉ et al., 2003).

A utilização da superestimulação possui uma limitação, a grande variabilidade da resposta aos tratamentos. Entre as causas de variação, a presença de folículos dominantes

no momento do início do tratamento é um fator grande de interferência (TERVIT et al., 1992; BALDASSARRE et al., 1994), pois a resposta ao FSH é inversamente proporcional a presença de folículos maiores que 5 mm (BREBION & COGNIÉ, 1989; COGNIÉ, 1999)

Uma vez que o diâmetro dos folículo a serem aspirados pode influenciar as taxas recuperação de COC's e desempenho da maturação *in vitro*, objetiva-se com este estudo, avaliar o padrão de crescimento folicular em ovelhas submetidas a aspiração de todos os folículos ovarianos guiada por laparoscopia (LOPU), seguida de superestimulação hormonal, visando a determinação do momento de maior disponibilidade de folículos com diâmetro entre 2,5 e 4,5mm.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e local de experimentação:

O experimento foi conduzido no “Laboratório de Estudos de Biotecnologia Aplicada a Reprodução de Ovinos e Caprinos” e “Laboratório de Endocrinologia” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ – UNESP, no município de Botucatu-SP; situado à latitude de 22°53' sul e longitude de 48°26' oeste, em altitude de 804 metros, na estação de primavera.

Foram utilizadas 5 ovelhas mestiças adultas selecionadas quanto à adequação do estado corporal, condição clínica e estatus reprodutivo, recebendo, *ad libitum*, durante o período experimental água e sal mineral com formulação adequada a ovinos, e ração completa peletizada específica para manutenção de ovelhas adultas.

A ciclicidade ovariana foi constatada em avaliações ultrassonográficas sequenciais a cada 24 horas durante sete dias buscando-se evidenciar a presença de corpo lúteo e também por meio de dosagem plasmática de progesterona em dois momentos intervalados de sete dias e de forma pareada.

Ablação folicular

Constatada a ciclicidade ovariana, as ovelhas (n=5) receberam pessário intravaginal de 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®]), mantido por 10 dias, com aplicação no quarto dia de 100µg de cloprostenol (Ciosin[®]). Após remoção do pessário intravaginal foi realizada a LOPU de todos os folículos visíveis em ambos os ovários.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas, e todos receberam penicilina benzatina 30.000UI/kg antes do procedimento. Foi realizada a anestesia pela associação de cetamina (5,0mg/kg), com cloridrato xilazina (0,2mg/kg), e anestesia peridural com 4 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor após bloqueio regional com lidocaína 2% com vaso constritor no local de introdução do cateter.

As ovelhas foram contidas em maca apropriada para a realização da laparoscopia, em posição trendelenburg, com inclinação de 45 graus. Foi realizada tricotomia na região abdominal e antissepsia com solução de clorexidine degermante a 2% e álcool 70°. Na região paramediana retrombilical esquerda foi então inserido um trocar (5 mm) com válvula para insuflar a cavidade e criar o pneumoperitônio, com pressão variando de 5 a 8 mmHg, sendo em seguida introduzida a sonda ótica por este trocar.

Foram inseridos na região paramediana retrombilical direita mais dois trocâteres de menor diâmetro para inserção das pinças atraumáticas de manipulação do útero, ovários, tubas-uterinas e do sistema de aspiração.

Para realização das aspirações o sistema era constituído de Linha para aspiração folicular[®], Rolha de alumínio para aspiração folicular[®], Haste para aspiração folicular[®] e Agulha para Aspiração Folicular em Ovinos[®] (WTA - Tecnologia Aplicada), e a pressão de vácuo utilizada foi de 40 mmHg gerada pela Bomba de Vácuo Digital BV 003d[®] (WTA - Tecnologia Aplicada)

No local de inserção dos trocâteres foi realizada sutura com fio de nylon 0, com ponto simples separado e aplicado *spray* de terramicina e hidrocortisona (Terracortril®)

Tratamento superestimulatório e acompanhamento ultrassonográfico da atividade ovariana

Imediatamente após o término da LOPUS foi administrado 80mg de FSH (Folltropin® V Bioniche Animal Health Product – Canada) associada a 300UI de ECG (Gonadotrofina Coriônica Equina - Novormon® - Schering-Pough).

Utilizando equipamento Aloka® Prosound 2 VET equipado com transdutor linear prostático de frequência 7,5 MHz (Modelo UST-660-7,5) foi realizada avaliação ultrassonográfica das estruturas ovarianas por um período de 64 horas, com intervalo de 8 horas entre as observações. Registrou-se o diâmetro e o ritmo de crescimento de todos os folículos detectáveis, que foram classificados como pequenos (< 2,5 mm); médios (2,5 a 4,5mm) e grandes (>4,5mm).

Ao término dos exames, os animais recebiam alimentação concentrada para produzir estímulo positivo ao condicionamento.

Forma de análise de resultados

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de comparações múltiplas de Dunn's, a 5% de probabilidade. Foi utilizado um gráfico de dispersão com a linha de tendência da distribuição e estabelecida, quando possível, a equação que melhor definisse o fenômeno. Estabeleceu-se por meio do modelo teórico o ponto de maior concentração de folículos com diâmetro entre 2,5 e 4,5mm.

RESULTADOS

Todas as ovelhas apresentaram atividade ovaria na avaliação ultrassonográfica, a partir da detecção de corpo lúteo ou constatação de ovulação nos exames ultrassonográficos realizados no período anterior à LOPU, confirmada com a dosagem pareada de

progesterona, sendo que todas as ovelhas apresentaram, em pelo menos um dos momentos, níveis plasmáticos iguais ou superiores a 1 ng/mL.

O monitoramento ultrassonográfico ao longo do tempo do crescimento folicular após a realização da LOPU e tratamento superestimulatório, está representado na Tabela 1 pela distribuição, de acordo com o diâmetros ultrassonográficos, em populações de folículos pequenos, médios e grandes.

A menor população de folículos pequenos (< 2,5mm) foi observada a partir das 56 horas após a realização da LOPU ($P < 0,05$). A maior população de folículos médios (2,5 a 4,5mm) foi observada entre as 24 e 48 horas após a LOPU ($P < 0,05$). A ocorrência de folículos grandes (> 4,5mm) manteve-se inalterada ao longo do período de observação ($P > 0,05$).

A população de folículos médios (Figura 1) apresentou uma distribuição parabólica ao longo do período de observação, representada pela equação $y = -0,0071x^2 + 0,4908x - 2,2214$, sendo o ponto teórico de maior concentração de folículos representado pelo vértice superior da parábola equivalendo à 34,6 horas ($X_v = -0,4908 / [2 \cdot (-0,0071)]$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento folicular após o tratamento apresentou comportamento de típico de onda de crescimento (Figura 1), onde conjunto de folículos pequenos observados a cada 8 horas após a LOPU, cresceram dando origem aos médios, alguns desses entraram em atresia restando apenas poucos folículos grandes, similar ao que ocorre com o padrão da dinâmica folicular do ciclo estral (GINTHER et al., 1994; RAVINDRA et al., 1994; LOPEZ-SEBASTIAN et al., 1997). Entretanto, por ser consequente de um tratamento superestimulatório o número de estruturas foi superior ao convencionalmente observado.

O estabelecimento, através de modelo teórico representado pelo vértice da distribuição parabólica, do ponto de maior concentração de folículos com diâmetro entre

2,5 e 4,5mm em 34,6 horas após a LOPU é de grande importância, uma vez que os folículos médios são os mais indicados para serem aspirados, visando-se a obtenção de COCs para a produção *in vitro* de embriões (COGNIE et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2006; KARAMI-SHABANKAREH & MIRSHAMSI, 2012). Folículos de pequenos diâmetro são de difícil visualização à aspiração e os folículos grandes além de resultarem em menores taxas de recuperação à aspiração, devido à maior viscosidade do fluido folicular, além de possuírem oócitos envelhecidos ou em estádios muito avançados de desenvolvimento e com as células do cómulo menos aderidas, favorecendo sua perda durante a aspiração (BALDASSARE, 1995; SENEDA et al, 2001).

As melhores respostas superestimulatórias se dão na ausência folículos grandes (BREBION et al., 1992, COGNIE, 1999), por possibilitar um ambiente ovariano ideal para resposta a estes tratamentos. No presente estudo a ablação folicular por laparoscopia mostrou-se eficiente no controle da população folicular ovariana, por promover a eliminação de todos os folículos, inclusive aqueles com oócitos envelhecidos e com maior diâmetro, uma vez que a presença de folículos grandes foi nula nas 24 horas subsequentes à LOPU.

Adicionalmente em relação a outras técnicas que visam o controle da população folicular ovariana, como a utilização de agonistas e antagonistas de GnRH (DUFFOUR et al., 2000; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; COGNIE et al., 2003; LÓPEZ-ALONSO et al., 2005), progestágenos associados a estrógenos (TAKADA et al., 2004), a ablação folicular por LOPU além de permitir o controle da população folicular ovariana, possibilita a utilização dos oócitos obtidos durante o procedimento de ablação folicular, elevando o número de estruturas recuperadas.

CONCLUSÕES

Em ovelhas, o trauma mecânico resultante da LOPU não interfere negativamente na resposta ao tratamento superestimulatório. A ablação de todos os folículos visíveis por laparoscopia é um método eficiente no controle da população folicular ovariana ao possibilitar a continuidade de crescimento a partir dos folículos pequenos. O padrão de desenvolvimento é caracterizado pela emergência de nova onda de crescimento folicular, após a LOPUS seguida de superestimulação ovariana, com maior ocorrência de folículos com diâmetro de 2,5 a 4,5mm entre 24 e 48 horas e com o ponto teórico de máximo às 34,6 horas, na população desses folículos.

AGRADECIMENTO:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Processo 2009/18419-2)

COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O estudo acima descrito, protocolo nº 105/2011, foi atestado como de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da FMVZ-Unesp-Botucatu, em 13 de maio de 2011.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D.G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1624–1632, 2001. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/64/6/1624.full>>. Acesso em: 15 mai. 2015. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1624>

BALDASSARRE, H. et al. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p.145-150, 1994a. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432094900140>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/0378-4320(94)90014-0

BALDASSARRE, H. et al. *In vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes collected by laparoscopic folliculocentesis. **Theriogenology**, v.41, p.159, 1994b. Disponível em:

<[http://ac.els-cdn.com/S0093691X0580069X/1-s2.0-S0093691X0580069X-main.pdf?_tid=3025ce38-fb26-11e4-ae20-](http://ac.els-cdn.com/S0093691X0580069X/1-s2.0-S0093691X0580069X-main.pdf?_tid=3025ce38-fb26-11e4-ae20-00000aabb0f27&acdnat=1431710396_0b7f945006e4c072b6ea88c26b0ede89)

[00000aabb0f27&acdnat=1431710396_0b7f945006e4c072b6ea88c26b0ede89](http://ac.els-cdn.com/S0093691X0580069X/1-s2.0-S0093691X0580069X-main.pdf?_tid=3025ce38-fb26-11e4-ae20-00000aabb0f27&acdnat=1431710396_0b7f945006e4c072b6ea88c26b0ede89)>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0093-691X(05)80069-X

BALDASSARRE, H. et al. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocytes donors.

Theriogenology, v.45, p.707-717, 1996. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X95004177>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/0093-691X(95)00417-7

BALDASSARRE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production reproduction technologies. **Theriogenology**, v. 57, p.275-284, 2002. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006719>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0093-691X(01)00671-9

BREBION, P.; COGNIE, Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. In: 5th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, França, 1989. **Proceedings of 5th Meeting on European Embryo Transfer Association**, Lyon, França, 1989, p.106.

BREBION, P. et al. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. **Annales de Zootechnie**, v. 41, p.331-9, 1992. Disponível em:

<<http://libra.msra.cn/Publication/42163644/transfert-d-embryons-chez-les-ovins-et-les->

[caprins](#)>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1051/animres:19920313

COGNIE, Y. et al. The in vitro production of goat embryos using individual oocytes from different sources. In: 12th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, França, 1996. **Proceedings of 12th Meeting on European Embryo Transfer Association**, Lyon, França, 1996, p.122.

COGNIE, Y. et al. Effect of follicle size and of the Fec^B Booroola gene on oocyte function in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.379-386, 1998. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/112/2/379>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1530/jrf.0.1120379

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p. 105-116, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98002350>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0093-691X(98)00235-0

COGNIE, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98002350>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0093-691X(98)00235-0

DUFOUR, J.J. et al. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. **Journal Reproduction Fertility**, v.118, p.85-94, 2000. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/118/2/303.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1530/jrf.0.1180303

DURINZI, K.L et al. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. **Fertility and Sterility**. V.63, p.404-406, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843451>>. Acesso em: 15 mai. 2015. PMID:

7843451(Resumo)

GINTHER, O.J. et al. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v.43, p. 689-703, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X94000745>>. Acesso em: 15 mai. doi:10.1016/0093-691X(94)00074-5

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology** v.57, p.1263–1272, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01007233>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0093-691X(01)00723-3

KARAMI-SHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S.M. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. **Small Ruminant Research**, v.105, p.244– 249, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448812000818>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.02.017

KHATIR, H et al. A. Effect of follicular size on in vitro developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). **Animal Reproduction Science**, v.99, p.413-420, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432006003009>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.06.015

LÓPEZ-ALONSO, C. et al. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single shortacting dose of GnRH antagonist. **Theriogenology**, v.64, p.1833–1843, 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001305>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.021

LOPEZ-SEBASTIAN, A. et al. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. **Animal Reproduction Science**, v.48, p. 279-291, 1997. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432097000560>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0378-4320(97)00056-0

RAVINDRA, J.P. et al. Ultrasonic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. **Journal Reproduction Fertility**, v.101, p.501-509, 1994. Disponível em:

<<http://www.reproduction-online.org/content/101/2/501.full.pdf+html?sid=e4f86576-e0fe-4279-9798-49fba6e8bf96>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1530/jrf.0.1010501

RODRIGUEZ, C. et al. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.106–113, 2006. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+16th+May+from+12%3A00-14%3A00+BST+%2807%3A00-09%3A00+EDT%29+for+up+to+two+hours+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x

SENEDA, M.M et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**. v.67, p.37–43, 2001. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432001001130>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0378-4320(01)00113-0

TAKADA, L. et al. Sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração durante a pré-estação reprodutiva em ovelhas Sufoolk. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.31, n.4, p.453-460, 2009. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/6938>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v31i4.6938>

TERVIT, H.R. et al. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. In: The Australian Society for Reproductive Biology 24th Annual Conference, Adelaide, Australia, 1992. **Proceedings of The Australian Society for Reproductive Biology 24th Annual Conference**, Adelaide, Australia, 1992 p.26.

WANIA, N.A. et al. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedures in sheep. **Small Ruminant Research**, v.34, p.71-76, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448899000462>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi:10.1016/S0921-4488(99)00046-2

Tabela 1 - Média $\pm$ dp da população de folículos pequenos ($\varnothing < 2$, mm), médios ($\varnothing = 2,5$ a $4,5$ mm) e grandes ($\varnothing > 4,5$ mm), presentes nas avaliações ultrassonográficas realizadas a cada 8 horas, após LOPU e superestimulação ovariana em ovelhas.

Folículo	Horas após LOPU							
	8	16	24	32	40	48	56	64
Pequenos	5,6 ^a $\pm 1,5$	3,2 ^{ab} $\pm 1,1$	4,0 ^a $\pm 1,2$	1,0 ^{ab} $\pm 1,2$	1,0 ^{ab} $\pm 1,2$	1,4 ^{ab} $\pm 1,5$	0,8 ^b $\pm 1,3$	0,2 ^b $\pm 0,4$
Médios	1,6 ^{bc} $\pm 1,14$	3,4 ^{bc} $\pm 1,14$	4,6 ^{ab} $\pm 1,52$	7,0 ^a $\pm 1,73$	7,0 ^a $\pm 2,45$	4,8 ^{ab} $\pm 2,28$	1,6 ^{bc} $\pm 1,5$	0,8 ^c $\pm 0,8$
Grandes	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,2 $\pm 0,4$	0,6 $\pm 0,8$	0,4 $\pm 0,5$	2,0 $\pm 1,2$	1,4 $\pm 0,8$

^{a,b,c} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças nos valores ($P < 0,05$)

$\varnothing$ = diâmetro do folículo

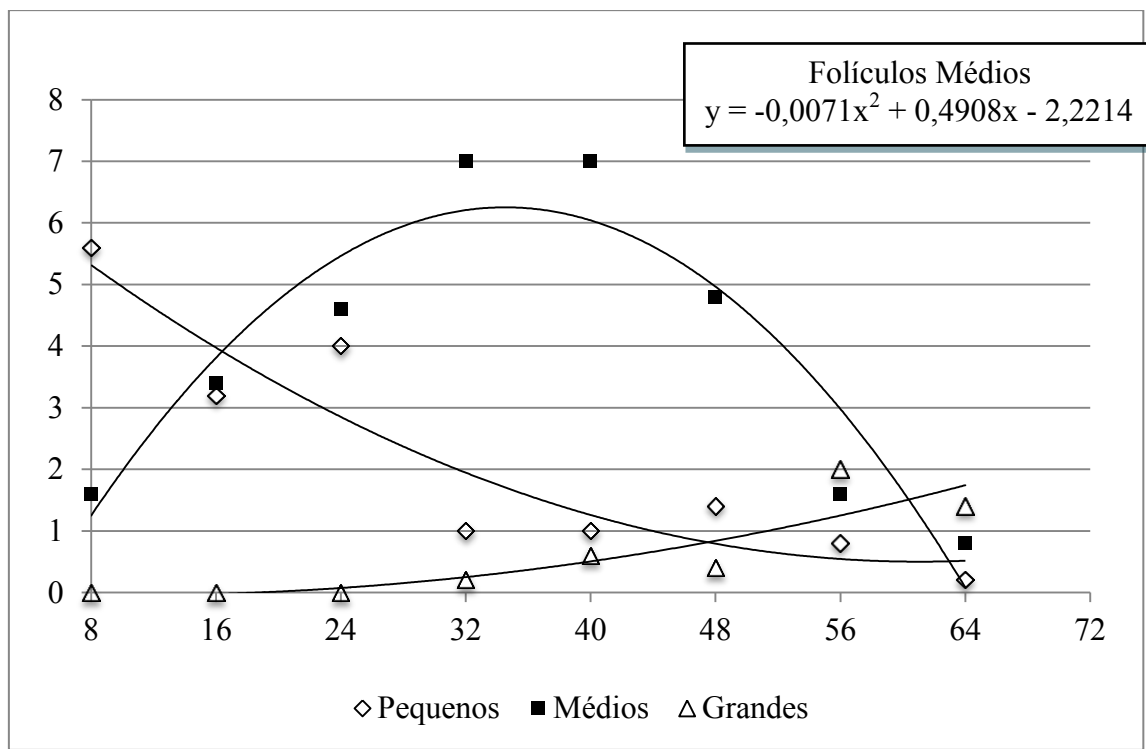


Figura 1. Linhas de tendência da população de folículos pequenos ($\varnothing < 2$, mm), médios ($\varnothing = 2,5$ e 4 mm) e grandes ($\varnothing > 4,5$ mm), presentes á avaliação ultrassonográfica realizada a cada 8 horas após LOPU e superestimulação ovariana. ($\varnothing$ = diâmetro do folículo)