

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DINÂMICA DE CORPOS LÚTEOS EM PROTOCOLOS COM
REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NA SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS**

Mariana Garcia Kako Rodriguez
Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DINÂMICA DE CORPOS LÚTEOS EM PROTOCOLOS COM
REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NA SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS**

Mariana Garcia Kako Rodriguez

Orientadora: Prof Dra. Maria Emília Franco Oliveira

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária, área de Reprodução
Animal.**

2016

R696d Rodriguez, Mariana Garcia Kako
Dinâmica de corpos lúteos em protocolos com redução da dose de
FSH na superovulação em ovelhas / Mariana Garcia Kako Rodriguez.
– – Jaboticabal, 2016
x, 78 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Maria Emília Franco Oliveira
Banca examinadora: Wilter Ricardo Russiano Vicente, Erika da
Silva Carvalho Morani
Bibliografia

1. Dosagem FSH exógeno. 2. Superestimulação. 3. Luteólise
prematura. 4. Ultrassom. 5. Ovino. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DINÂMICA DE CORPOS LÚTEOS EM PROTOCOLOS COM REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NA SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS

AUTORA: MARIANA GARCIA KAKO RODRIGUEZ

ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora ERIKA DA SILVA CARVALHO MORANI

INPRENHA / Top in Life Biotecnologia e Genética Animal - Jaboticabal/SP



Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mariana Garcia Kako Rodriguez– Nascida em Taubaté (SP), 05 de abril de 1988. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná/ UNICENTRO, Campus de Guarapuava (2013). Possui especialização em Clínica Médica e Reprodução de Bovinos pela Universidade Tuiuti do Paraná (2013). Atualmente, é mestranda do programa de Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP, Campus de Jaboticabal. Tem experiência na área de Ultrassonografia, Fisiologia Reprodutiva e Biotecnologias da Reprodução, com ênfase em programas de múltipla ovulação transferência de embrião (MOTE) e videolaparoscopia em ovinos, atuando em Reprodução e Diagnóstico por Imagem em pequenos ruminantes.

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem"

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, José Rodriguez Garcia e Maria Elizabete Castilho Kako Rodriguez, por me apoiarem em todos os momentos e, mostrarem o quanto os bons valores são importantes, pelo amor e dedicação à mim, pelo exemplo de paciência, perseverança e luta.

Aos meus falecidos avós, Rosário e Odilo, por iluminarem meu caminho e serem meu anjo da guarda. Assim como minha avó Maria, ainda viva.

À Deus, por me guiar, dando forças para não desistir.

Aos meus irmãos, Juliana, Du e Rodrigo, obrigada por me estarem sempre ao meu lado e me estimularem a crescer e lutar pelos meus objetivos.

À minha parceira de trabalho que se tornou uma grande amiga e afilhada, Giovanna, obrigada pela parceria, paciência, aprendizado e por entrar na minha vida tornando-se como irmã.

À minha orientadora, pelos ensinamentos e conselhos, por me estimular a crescer e me esforçar para conquistar metas, por toda ajuda e tempo oferecido à mim, muito obrigada!

Aos meus amigos e equipe que contribuíram com meu trabalho: Victor, Ricardo Nociti, Ricardo Ramirez, Marjury, Ana Paula, Priscila, Renata, Dayane, Felipe, Rozana, Amanda, Marina, Juliane, Beatriz e Darcio obrigada pela sintonia, pela disposição, pela paciência, por toda ajuda e apoio, sem vocês o experimento não aconteceria.

Ao meu amigo e afilhado, Marcus, por sempre me motivar e incentivar, pelo afeto, conselhos, compreensão e muita ajuda.

Ao meu professor Pedro Paulo, pela ajuda no início do experimento, quando eu mais precisei, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao professor Wilter, por sempre estar disposto a ajudar e caminhar de mãos dadas, por me acolher e aconselhar, por se preocupar com meu bem-estar pessoal e profissional, muito obrigada!

As minhas amigas, Marcela e Andresa, e aos meus amigos André e Damásio, por me acolherem em momentos difíceis e me ajudarem sempre quando precisei.

Aos funcionários, especialmente Seu Edson por estar sempre ao nosso lado auxiliando no trabalho, pela sua amizade.

À todos do Departamento de Reprodução Animal, que me receberam de “braços abertos” e estavam sempre disponíveis para qualquer auxílio.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por disponibilizar a silagem e, o laboratório para realizar o exame de OPG de nossas ovelhas.

À professora Jane do Departamento de Zootecnia, por nos emprestar carneiros reprodutores.

Aos estagiários que me acompanharam, obrigada pelo respeito e assistência.

À CAPES pela bolsa concedida.

À EMBRAPA, pelo auxílio financeiro (nº 02.13.06.026.00.00), PROPE nº TC1288/2015.

À todos que de alguma forma ajudaram neste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....	10
1. Introdução.....	10
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1 Formação, composição e função do corpo lúteo.....	12
2.2 Luteólise fisiológica.....	13
2.3 Superovulação em ovelhas.....	14
2.4 Regressão prematura dos corpos lúteos.....	15
2.5 Ultrassonografia dos ovários.....	16
3. Referências.....	18
CAPÍTULO 2 – Dinâmica de corpos lúteos em protocolos com redução da dose de FSH na superovulação em ovelhas.....	23
Resumo	23
Introdução.....	24
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão	30
Conclusão.....	39
Referências.....	40



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12062/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da dose de FSH na superestimulação gonadotrófica sobre a resposta superovulatória, funcionalidade de corpos lúteos e produção in vivo de embriões em ovelhas Santa Inês"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Maria Emilia Franco Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.

Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

DINÂMICA DE CORPOS LÚTEOS EM PROTOCOLOS COM REDUÇÃO DA DOSE DE FSH NA SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS

RESUMO – Um dos grandes entraves da MOTE é a ocorrência de falhas no tratamento superovulatório, sendo que uma das causas pode ser a alta dose de FSH, podendo promover regressão prematura dos corpos lúteos e consequentemente uma resposta ineficaz ao tratamento superovulatório. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dose de FSH exógeno no tratamento superestimulatório sobre a dinâmica de desenvolvimento e funcionalidade de corpos lúteos em fêmeas ovinas doadoras de embrião. Foram utilizadas 29 ovelhas Santa Inês, as quais foram submetidas à sincronização do estro com um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®), inserido no Dia 0, permanecendo até o Dia 8. Concomitantemente ao início do protocolo e retirada do dispositivo intravaginal foi administrado um análogo da PGF2 α . O tratamento gonadotrófico teve início 48 horas antes da retirada da progesterona (D6), quando as fêmeas foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais de acordo com a dose total de FSH suíno exógeno: G200 (controle, n=8) - 200 mg de FSH; G133 (n=8) - 133 mg de FSH; e G100 (n=8) - 100 mg de FSH. No D6 (1ª aplicação de FSH), as fêmeas receberam também 300 UI de eCG. As avaliações ultrassonográficas Modo-B e Doppler foram realizadas durante o período de luteogênese (D11) até o dia correspondente a videolaparoscopia (D15), com o propósito de acompanhar o desenvolvimento das estruturas lúteas (dimensões), avaliar os índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana (VPS, VDF, IR e IP) e, de avaliar macroscopicamente as características dos corpos lúteos formados e classificá-los em normais ou subnormais (regredidos prematuramente), através da videolaparoscopia. A análise estatística foi realizada por meio do software R®, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. As ovelhas superovuladas com 100 e 133 mg de FSH apresentaram um aumento gradativo do diâmetro dos corpos lúteos com passar dos dias pós-ovulação ($p < 0,001$), diferentemente, os animais que receberam o tratamento de 200 mg de FSH apresentaram aumento do diâmetro entre os dias 11 e 13 e diminuição nos dias 14 e 15 ($p < 0,001$). As ovelhas expostas ao tratamento superestimulatório com 200 mg de FSH apresentaram maior percentual de RPCL (49,03) em relação as dos grupos tratados com 100 e 133 mg de FSH ($p < 0,001$). A VDF foi maior nas ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH um dia após as ovulações (D11) do que nas superovuladas com 100 mg de FSH ($p = 0,029$). O IR foi maior nas ovelhas superovuladas com 200 mg do que quando superovuladas com 100 mg de FSH ($p = 0,02$). E o IP foi maior nos dias 14 e 15 do que nos demais dias avaliados ($p < 0,01$). Conclui-se que a ultrassonografia é uma ferramenta eficaz para acompanhar a dinâmica luteal em ovelhas superestimuladas e, as menores doses de FSH exógeno foram suficientes para uma eficiente resposta superovulatória em ovelhas, proporcionando menor custo no tratamento gonadotrófico de fêmeas doadoras de embriões.

Palavras-chave: dosagem FSH exógeno, superestimulação, luteólise prematura, ultrassom, ovino.

DYNAMICS OF CORPORA LUTEA IN PROTOCOLS WITH REDUCTION OF FSH DOSE IN SUPEROVULATION IN EWES

ABSTRACT - One of the major obstacles of MOTE is occurrence of failures in superovulation, and one reason may be the high dose of FSH, which can promote premature regression of the corpus luteum and therefore ineffective response to superovulation. The aim of the present study was to evaluate the effect of exogenous FSH dose in superstimulatory treatment on development dynamic and function of corpora lutea in embryo donor ewes. Twenty-nine Santa Inês ewes were submitted to estrus synchronization with an intravaginal progesterone device (CIDR®), which was inserted on Day 0 and was remain until the Day 8. At the same time the beginning of the protocol and intravaginal device withdrawal was administered an analog of PGF2 α . The gonadotropin treatment was commenced 48 hours before the CIDR withdrawal (D6), when females are randomly divided into three groups according to the total dose of exogenous porcine FSH: G200 (control, n = 9) - 200 mg of FSH ; G133 (n = 10) - 133 mg FSH; and G100 (n = 10) - 100 mg of FSH. The total doses were administered in 8 to applications at 12 hour intervals (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5 and 5% FSHp). In D6 (1st application FSH), females also received 300 IU of eCG. Evaluations ultrasound mode-B and Doppler were performed during the luteogênese period (D11) until the corresponding day of videolaparoscopy (D15), in order to follow the development of luteal structures (dimensions), evaluate the contents of the artery blood flow ovarian (VPS, EDV, RI and PI), and macroscopically evaluate the characteristics of the formed corpora lutea and classify them as normal or subnormal (premature regression) by laparoscopy. Statistical analysis was performed using the software R®, the level of significance was set at $p < 0.05$. The superovulated sheep with 100 and 133 mg of FSH showed a gradual increase in the diameter of corpora lutea with passage of post-ovulation days ($p < 0.001$), by contrast, the animals receiving treatment 200 mg of FSH showed increased diameter between 11 and 13 and decreased in 14 and 15 ($p < 0.001$). The sheep exposed to superstimulatory treatment with 200 mg of FSH presented higher RPCL (49,03) in relation to the groups treated with 100 and 133 mg of FSH ($p < 0.001$). The VDF was higher in superovulated sheep with 133 mg of FSH one day after the ovulation (D11) than in the superovulation 100 mg of FSH ($p = 0.029$). The IR was higher in superovulated sheep with 200 mg of superovulated that when 100 mg of FSH ($p = 0.02$). And the IP was higher in 14 and 15 than in the remaining days ($p < 0.01$). The conclusion is that ultrasound is a powerful tool for tracking the luteal dynamics superstimulated sheep and minor exogenous FSH doses were sufficient for efficient superovulatory response in sheep, providing lower cost for the gonadotrophin treatment of female donors embryos.

Keywords: exogenous FSH dosage, superestimulation, premature luteolysis, ultrasound, ovine.

LISTA DE ABREVIATURAS

CL – Corpo lúteo

CLs – Corpos lúteos

eCG - Gonadotrofina coriônica equina

FDA – Fibra em detergente ácido

FSH - Hormônio folículo estimulante

IP - índice de pulsatividade

IR - índice de resistência

máx - máximo

mm - milímetro

mg – Miligramas

MOTE – Múltipla ovulação e transferência de embriões

MHz – Mega-hertz

mín - mínimo

mL - Mililitros

ng – nanograma

NNP – Nitrogênio não proteico

PGF₂ α - Prostaglandina

RPCL – Regressão prematura dos corpos lúteos

UI - Unidade internacional

VDF - Velocidade diastólica final

VPS - Velocidade de pico sistólico

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias e desvios padrões dos diâmetros (em mm) dos corpos lúteos das ovelhas submetidas à superovulação com 100 (G100), 133 (G133) e 200 (G200) mg de FSH, durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação (Dia 0 = início dos protocolos superovulatórios)..... 32
- Tabela 2** - Médias e desvios padrões da velocidade diastólica final (VDF) da artéria ovariana em relação aos dias (D) de avaliação ultrassonográfica (durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação, sendo que Dia 0 = início dos protocolos superovulatórios) e, em relação aos tratamentos superestimulatórios com 100 mg de FSH (G100), 133 mg de FSH (G133) e 200 mg de FSH (G200). Demonstrando a significância através do valor de P ($<0,05$)..... 33
- Tabela 3** - Médias e desvios padrões dos índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana em relação aos dias (D) de avaliação ultrassonográfica (durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação, sendo que Dia 0 = início dos protocolos superovulatórios) e, em relação aos tratamentos superestimulatórios com 100 mg de FSH (G100), 133 mg de FSH (G133) e 200 mg de FSH (G200). Demonstrando a significância através do valor de P ($<0,05$)..... 35
- Tabela 4** - Médias e desvios padrões do número de folículos anovulatórios, corpos lúteos (CLs) totais, CLs normais, CLs regredidos prematuramente, nos dias correspondentes ao início da luteogênese ao quarto a quinto dia após a ovulação, em relação as ovelhas superovuladas com diferentes doses de FSH..... 37
- Tabela 5** - Taxas de corpos lúteos regredidos prematuramente e corpos lúteos normais em relação aos grupos de ovelhas superovuladas com 100 (G100), 133 (G133) e 200 (G200) mg de FSH, durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação..... 39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema ilustrativo do protocolo superovulatório utilizado durante o experimento..... 27
- Figura 2** - Mensuração pela ultrassonografia, da altura máxima e do diâmetro transversal máximo dos corpos lúteos (em mm) de ovelhas superovuladas, durante o 15º dia (cinco à seis dias após a ovulação) do protocolo superovulatório..... 29
- Figura 3** - Obtenção dos índices do fluxo sanguíneo (VPS, VDF, IR e IP) da artéria ovariana de ovelhas superovuladas, pela ultrassonografia doppler espectral. VPS=velocidade de pico sistólico; VDF=velocidade diastólica final; IR=índice de resistibilidade; IP=índice de pulsatividade..... 29

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

A produção *in vivo* de embriões é uma potente tecnologia para acelerar o melhoramento genético em pequenos ruminantes (AMIRIDIS & CSEH, 2012). Apesar de não existir levantamento oficial do emprego desta biotécnica em ovinos e caprinos pode-se observar o sucesso desta prática (OLIVEIRA, 2011) pelo cenário de amplo crescimento e acelerada multiplicação dos rebanhos em todo mundo (OLIVEIRA et al., 2013a).

É inegável a importância dessa técnica na reprodução de animais, todavia a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovinos necessita de estudos e maior compreensão de seus fenômenos para o incremento em eficiência, especialmente relacionada as respostas aos tratamentos superovulatórios e produção de embriões viáveis. Um dos entraves da MOTE é a regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), a qual tem sido considerada como um grande obstáculo na produção *in vivo* de embriões, pois tem ocorrido em até 75% das ovelhas superestimuladas (LOPES JÚNIOR et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013d).

Considera-se luteólise prematura, a regressão do corpo lúteo que acontece antes do momento em que o endométrio inicia fisiologicamente a secreção pulsátil de PGF2 α em um ciclo estral (SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2008), ou seja antes da fase final do diestro. A evidência da regressão luteal precoce é confirmada pela concentração de progesterona plasmática abaixo de 1 ng/mL (CERVANTES et al., 2007). Esta falha pode indiretamente funcionar como um fator tóxico para o embrião (CERVANTES et al., 2007), gerando como principal consequência baixa taxa de recuperação de embriões viáveis (SALLES et al., 1998; GOMES et al., 2014), visto que a colheita de embriões ocorre entre os dias 6 e 8 após o início do estro (OLIVEIRA et al., 2013a).

As causas da RPCL não estão completamente elucidadas, contudo é justificável a exacerbada ocorrência deste evento em fêmeas submetidas a protocolos superovulatórios. Independentemente da gonadotrofina empregada há registros de elevado número de corpos lúteos acometidos. Acredita-se que tal alteração na dinâmica ovariana e endócrina seja em virtude do uso de doses consideradas altas (KAFI & MCGOWAN, 1997), as quais podem induzir um estímulo prolongado sobre os

folículos que, por sua vez, não ovulam (folículos anovulatórios ou persistentes) e permanecem produzindo estrógeno durante a fase lútea inicial, ocasionando dessa maneira a liberação precoce de PGF2 α e regressão luteal (OKADA *et al.*, 2000; FONSECA & SIMPLÍCIO, 2008).

Em ovinos, emprega-se comumente protocolos superovulatórios com doses altas (OLIVEIRA *et al.*, 2013b) de FSH por ovelha estimulada (OLIVEIRA *et al.*, 2014) enquanto em bovinos as doses usuais são bem menores. Os registros na literatura de estudos neste sentido ainda são escassos (WU *et al.*, 2011; LOIOLA FILHO, 2013), tampouco há resultados referentes aos efeitos sobre a dinâmica de desenvolvimento dos folículos, quiçá sobre o contexto da regressão prematura dos corpos lúteos.

O diagnóstico desta alteração de funcionalidade dos corpos lúteos requer o emprego de técnicas que possibilitem a avaliação macroscópica de suas características, como pela laparotomia ou laparoscopia, as quais são consideradas invasivas. Apesar de não se ter estudos comprovando, acredita-se que outra ferramenta diagnóstica seria a avaliação histológica, entretanto, ainda mais invasiva (BAITHALU *et al.*, 2013), sugerindo a dificuldade de diagnosticar RPCL.

Pelos métodos de detecção da RPCL apontados, denota-se o grande pleito por estabelecer ferramentas alternativas para o diagnóstico rápido, prático, eficiente e não invasivo. Acredita-se que a ultrassonografia seja o método mais viável para este fim, no entanto, não há estudos que comprovem com procedimento diagnóstico eficaz para a RPCL. Sabe-se que a ultrassonografia dos ovários é muito útil para detectar as estruturas ovarianas e acompanhar eventos como o desenvolvimento folicular e do corpo lúteo (OLIVEIRA, *et al.*, 2013a). Diferenças em ecogenicidade e ecotextura destas estruturas já foram indicadas ao longo da fase luteal do ciclo estral em ovelhas (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000). A avaliação da função luteal por meio de análise de atributos das imagens ultrassonográficas também foi estudada em cabras, por ARASHIRO *et al.* (2010), os quais indicaram pequena correlação entre ecotextura do CL e sua função esteroideogênica, demonstrando o potencial limitado de diagnóstico ultrassonográfico da função luteal em caprinos. Vale destacar que os autores realizaram apenas a ultrassonografia convencional.

Sabe-se que recentemente a ultrassonografia Doppler tem sido empregada com o objetivo de aprimorar os conhecimentos fisiológicos da reprodução, como por exemplo pelo estudo da vascularização de corpos lúteos (BARBOSA & SILVA, 2012; LÜTTGENAU & BOLLWEIN, 2014). Uma vez que, este sistema vascular representa

50% das células que os constituem (SALLES & ARAÚJO, 2010), a investigação neste âmbito apresenta extrema relevância. Assim projeta-se que na RPCL seja possível detectar diferenças em relação às estruturas funcionais.

Neste contexto, denota-se a grande importância deste estudo, o qual busca aperfeiçoar a utilização de protocolos de FSH com doses reduzidas em ovinos, assim como, potencialmente definir ferramenta diagnóstica efetiva da qualidade e funcionalidade dos corpos lúteos pelo emprego da ultrassonografia.

1. Revisão de Literatura

2.1 Formação, composição e função do corpo lúteo

O crescimento, diferenciação, reorganização e luteinização das células da granulosa e da teca remanescentes do folículo ovulatório, resultam na formação do corpo lúteo (CL) (BERTAN *et al.*, 2006). O CL é formado principalmente pela ação do hormônio luteinizante (LH) e envolve uma cascata de mudanças funcionais e fenotípicas a partir da ruptura das células da granulosa e da teca. O suporte de LH é obrigatoriamente para a diferenciação celular e crescimento inicial do CL (BARTLEWSKI *et al.*, 2011).

O CL da ovelha é composto pelas células luteais esteroidogênicas pequenas e grandes derivadas das células da teca e da granulosa, respectivamente (VONNAHME *et al.*, 2006; BARTLEWSKI *et al.*, 2011). O CL também contém células endoteliais, fibroblastos, muscular lisa e do sistema imune, as quais interagem para manter a função luteal normal durante o crescimento, diferenciação e regressão (VONNAHME *et al.*, 2006).

Durante seu desenvolvimento, o CL sofre um período rápido de crescimento que envolve a hipertrofia das células da granulosa luteinizadas, hiperplasia do tecido conectivo fibroblástico e aumento da vascularização (SANGHA *et al.*, 2002; BERTAN *et al.*, 2006; SMITH & MEIDAN, 2014), podendo alcançar diâmetro máximo de 11-14 mm entre o dia 9 e 10 após a ovulação (BARTLEWSKI *et al.*, 2011). A angiogênese é necessária para o desenvolvimento do CL bem como para proporcionar a capacidade esteroidogênica de secretar grandes quantidades de progesterona (P4) (MIYAMOTO *et al.*, 2013). A intensidade do processo angiogênico

dentro do CL, atinge o pico de 2-3 dias após a ovulação (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004)

As células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório sintetizam estradiol e após o pico pré ovulatório de LH e ovulação são reorganizadas para formarem o CL e passam a ter como principal produto secretado a P4 (SANGHA *et al.*, 2002; BERTAN *et al.*, 2006). Este hormônio oferece o suporte para implantação e manutenção da prenhez e quando esta não ocorre o útero começa a liberar, de maneira pulsátil, prostaglandina F2 α (PGF2 α) para induzir a regressão do CL (MIYAMOTO *et al.*, 2013).

2.2 Luteólise fisiológica

A regressão do CL é promovida durante a luteólise, o qual a principal substância responsável é a PGF2 α , sendo secretada pelo endométrio num padrão pulsátil atingindo o CL através de um sistema contra-corrente entre veia uterina e artéria ovarica (BERISHA & SCHAMS, 2005; BERTAN *et al.*, 2006; SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2008). Em ovelhas, a regressão ocorre em torno do dia 15 à 17 do ciclo estral, isso diretamente induz o decréscimo de P4 circulante e, subsequentemente, um aumento na onda de LH (MIYAMOTO *et al.*, 2013).

O processo luteolítico, o qual esta sob o controle da prostaglandina, consiste em duas fases: luteólise funcional e estrutural, que são refletivas predominantemente pela diminuição na progesterona (P4) e decréscimo no tamanho luteal respectivamente (VONNAHME *et al.*, 2006; GIOMETTI *et al.*, 2009). De acordo com o estudo de Simões *et al.* (2007), a diminuição da concentração de P4 plasmática parece começar 2 dias antes de iniciar a regressão do corpo lúteo.

Durante a regressão luteal, células endoteliais degeneram, mas o número de células da musculatura lisa e pericitos (reguladores da função endotelial) continua alto, estas mudanças vasculares ocorrem simultaneamente com a redução do status funcional do CL (VONNAHME *et al.*, 2006). Smith & Meidan (2014) acreditam que diferentes tipos celulares, especificamente leucócitos e células endoteliais, agem em conjunto com as células do parenquima luteal para realizar a regressão do CL.

Apesar de a principal responsável pela luteólise ser a $\text{PGF2}\alpha$, ela não é o único hormônio envolvido neste processo, vários outros hormônios fatores de crescimento e peptídeos vasoativos controlam este processo (GIOMETTI et al, 2009). Como por exemplo o óxido nítrico (ON), um vasodilatador local que aumenta o fluxo ovariano e, pode desempenhar um papel luteolítico direto na regressão do CL (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). Em ovinos, o ON endotelial diminui a expressão da proteína sintase na regressão do CL, o qual foi associado com a diminuição nas células endotéliais, pericitos e vasculatura (EL-SHERRY et al, 2013).

Vários mecanismos da regressão do CL tem sido sugeridos para explicar a resposta estágio-específico para $\text{PGF2}\alpha$, incluindo efeitos indiretos do óxido nítrico, endotelina 1 (EDN-1), fator de necrose tumoral α ($\text{TNF}\alpha$) e efeitos diretos da $\text{PGF2}\alpha$ nas células luteais. Entretanto, nenhum desses mecanismos explicam satisfatoriamente os feitos luteolíticos da $\text{PGF2}\alpha$ refletindo na regressão prematura do CL (SMITH & MEIDAN, 2014).

1.3 Superovulação em ovelhas

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) apresentam inúmeras vantagens, tais como incremento produtivo, maximização do controle de doenças (GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005), maior possibilidade de importação e exportação de embriões, facilidade quanto aos testes de progênie, além do que proporciona uma rápida multiplicação de material genético superior com ganhos ao melhoramento genético dos rebanhos (ARAÚJO DOS SANTOS & LIMA, 2010).

Considera-se superovulação, quando um a quatro folículos alcançam o diâmetro ovulatório estimulados por hormônios que proporcionam seu crescimento, promovendo múltiplas ovulações (Evans, 2003).

A superovulação foi por muitos anos realizada com utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG), a qual possui uma meia-vida longa (aproximadamente 72 horas), promovendo estímulo prolongado aos folículos e consequentemente maior taxa de embriões degenerados ou de baixa qualidade, assim como RPCL (SAHARREA et al., 1998; GOMES et al., 2014). Pelos prejuízos à eficiência da superovulação com eCG, começou a ser popularizado o uso do FSH em tratamentos

gonadotróficos, visto sua meia-vida mais curta (aproximadamente 6 horas) e seus melhores resultados (como revisado por OLIVEIRA et al., 2011 e GOMES et al., 2014).

Apesar da grande importância e progresso da MOTE em ovinos, são registradas limitações quanto ao custo e metodologia, especialmente da técnica de colheita dos embriões (GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005; CARNEIRO, 2009; ARAÚJO DOS SANTOS & LIMA, 2010; GUSMÃO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013a), bem como falhas na resposta folicular ao hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno, ocorrência de regressão prematura do corpo lúteo (OLIVEIRA et al., 2009), reduzido número de embriões viáveis produzidos, efeito da ordem de coleta sobre a resposta superovulatória, além de interferência na eficiência da biotécnica em virtude de falhas associadas ao manejo, como condição corporal, dieta e estresse térmico (GOMES *et al.*, 2014).

Usualmente, a dose total de FSH utilizada por ovelha submetida à protocolos superovulatórios é de 256 mg (OLIVEIRA *et al.*, 2013b) ou 200 mg de FSH (Folltropin®) (MENCHACA et al., 2009; CUETO et al., 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014), promovendo um estímulo prolongado sob os folículos, os quais continuam produzindo estrógenos, levando a RPCL (FONSECA, 2005). Em vacas, valores bem menores (100 ou 133 mg) são usuais; fato que indica a real necessidade de estudos que abordem o uso de doses menores de FSH em ovinos para promover melhor eficiência e diminuir a variabilidade da resposta superovulatória (FONSECA, 2005).

1.4 Regressão prematura dos corpos lúteos

Em pequenos ruminantes, a RPCL é um fenômeno comum em fêmeas ovinas não superestimuladas em períodos de transição de condições de anestro para ciclicidade (isto é, puerpério, final da estação reprodutiva favorável e início da puberdade) (OLIVEIRA et al., 2013b), manifestando-se na forma de ciclos estrais curtos. Esta ocorrência é exacerbada em ovelhas, cabras e vacas superovuladas (FONSECA, 2005; FONSECA 2006), relatando-se o acompanhamento de baixa qualidade e taxa de recuperação de embriões viáveis em bovinos (SALLES *et al.*, 1998; FILHO & VASCONCELOS, 2008; CARNEIRO, 2009).

A RPCL é usualmente identificada em aproximadamente quatro dias após o estro [momento em que se torna mais evidente (FONSECA, 2005; GOMES *et al.*, 2014)], quando a concentração de progesterona plasmática se encontra abaixo de 1ng/mL, causada pela liberação prematura de PGF2 α (CERVANTES *et al.*, 2007).

Outro sinal típico de regressão luteal precoce é a coloração rosa pálida do CL (GUSMÃO *et al.*, 2013).

As causas da RPCL não estão completamente elucidadas, acredita-se que pode ser devido: (1) à maturação inadequada (por exemplo, desenvolvimento de receptores gonadotróficos ou habilidade máxima de sintetizar estradiol) do folículo pré ovulatório no momento do pico pré-ovulatório de LH (STUBBINGS & WALTON, 1986); (2) ao desajustado suporte gonadotrófico; (3) a inabilidade do CL em responder às gonadotrofinas; (4) ao estímulo luteolítico precoce; (5) à maior sensibilidade do CL a substâncias luteolíticas (como revisado por SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2008); ou (6) pelas elevadas concentrações de estradiol durante a fase luteal inicial (SAHARREA *et al.*, 1998) em virtude da presença de folículos persistentes (OKADA *et al.*, 2000) e/ou devido a falhas na pré-exposição de P4, que pode exercer efeito direto ou indireto, por maior secreção de estrógeno pelo folículo pré-ovulatório e, consequentemente ativação da liberação de PGF2 α (revisado por SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2008).

Ademais, vale destacar que os corpos lúteos regredidos prematuramente, também definidos como subnormais, são estruturas pequenas (< 5 mm), com coloração rosa pálida a acinzentado e com pouca ou nenhuma protrusão a partir da superfície do ovário (RUBIANES *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2009; BAITHALU *et al.*, 2013; GUSMÃO *et al.*, 2013).

2.5 Ultrassonografia dos ovários

A ultrassonografia dos ovários é muito útil para avaliar a ovulação e o tamanho do CL. Por meio da ultrassonografia convencional (modo-B) é possível detectar o estágio do ciclo estral, apresentando hipoeogenicidade padrão somente após a ovulação, a ecogenicidade aumenta a partir do dia 3-4 do ciclo estral e começa a homogenizar e normoecogenizar ou discretamente hiperecogenizar durante a fase luteal, tornando-se hiperecogênico após a luteólise (BULNES *et al.*, 2000). Ademais, a ecotextura luteal reflete, indiretamente, a produção de progesterona (SIQUEIRA *et al.*, 2006).

A detecção do CL em ovelhas pela ultrassonografia convencional é melhor entre os dias 3 e 4 do ciclo estral, pois é neste período que o CL alcança o máximo diâmetro, entretanto no dia 17 há mudança na vascularização do CL e, em seguida,

diminuição gradativa do seu tamanho (SIMÕES *et al.*, 2007). Por essa mudança de vascularização, a utilização da ultrassonografia Doppler é de grande valia para detectar a funcionalidade do CL.

A ultrassonografia Doppler tem sido muito usada na medicina veterinária, pelo fato de fornecer informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos, como por exemplo o ovário e mais especificamente o CL, possibilitando detectar a presença, a direção e o tipo do fluxo sanguíneo (BARBOSA & SILVA, 2012). Uma vez que o sistema vascular do corpo lúteo representa 50% das células que o constituem (SALLES & ARAÚJO, 2010).

Durante a luteólise, há liberação dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que induzem um aumento agudo no fluxo sanguíneo (expresso pelo aumento da área colorida pelo Doppler), seguido de posterior queda dele em função da liberação local de peptídeos vasoativos que induzem diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, vasoconstrição, que causa o decréscimo da área colorida pela ultrassonografia Doppler (AYRES & MINGOTI, 2012).

A associação da ultrassonografia transretal com a concentração de progesterona plasmática tem sido muito usada para avaliar a função do CL. Todavia, deve-se levar em conta que durante a luteólise há diferença no tempo em que ocorre a regressão funcional, medida pela progesterona plasmática, e a regressão morfológica, medida pela área do tecido luteal: a concentração de progesterona plasmática decresce mais rapidamente e abruptamente que a área do tecido luteal, devido a mudanças vasculares que ocorrem no CL (ARASHIRO *et al.*, 2010).

Contudo, o exame do ovário pela técnica ultrassonográfica em ovelhas não tem sido bem desenvolvido (BULNES *et al.*, 2000). Necessitando de maiores estudos sobre a dinâmica folicular e funcionalidade dos corpos lúteos.

2. Referências

- AMIRIDIS, G.S; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, n. 130, p. 152-161, 2012.
- ARASHIRO, E.K.N; PALHAO, M.P; SANTOS, J.R.L; FONTES, R.C; SIQUEIRA, L.G.B; HENRY, M; VIANA, J.H.M. Tree-dimensional modeling of color Doppler images: a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 662-669, 2013.
- ARASHIRO, E.K; FONSECA, J.F; SIQUEIRA, L.G.B; FERNANDES, C.A; BRANDÃO, F.Z; OBA, E; VIANA, J.H. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. **Small Ruminant Research**, article in press, 2010.
- ARAÚJO DOS SANTOS, E.A; LIMA, G.L. Aplicação das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 43-50, 2010.
- AYRES, H; MINGOTI, J.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista brasileira de reprodução animal**, n. 3, v. 36, p. 174-180, Belo Horizonte, jul/set de 2012.
- BAITHALU, R.K; SINGH, S.K; GUPTA, C; RAJA, A.K; SAXENA, A; KUMAR, Y; SINHG, R; AGARWAL, S.K. Cellular and functional characterization of Buffalo (*Buballus bubalis*) corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 140, p.138-146, 2013.
- BARBOSA, C.C; SILVA, L.D.M. Ultrassonografia Doppler para avaliação reprodutiva de fêmeas. **Revista brasileira de reprodução animal**, n. 4, v. 36, p. 220-224, Belo Horizonte, out/dez de 2012.
- BULNES, A.G; MORENO, J.S; BRUNET, A.G; SEBASTIAN, A.L. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 35, p. 65-68, Berlin, 2000.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em caprinos: protocolos e ferramentas visando uma maximização reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 50-54, 2009.

CERVANTES, M.J; JUARÉZ, M.L; MEJÍA, V.O; BERRUECOS, V.J.M; VERA, A.H; VALENCIA, J. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. **Animal Reproduction Science**, v.97, p. 47-54, 2007.

CUETO, M.I; GIBBONS A.E; PEREYRA-BONNET, F; SILVESTRE, P; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in fine-wool Merinos maintained under field conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 770-775, 2011.

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

FONSECA, J.F. Otimização da Eficiência Reprodutiva em Caprinos e Ovinos. In: Encontro Nacional de Produção de Caprinos e Ovinos, 2006, Campina Grande. Anais. Campina Grande, 2006. 10f.

GOMES, M.G.T; VARAGO, F.C; HENRY, M.R.J.M; BORGES, I; MARTINS, T.L.T, FERREIRA, D.A. Fatores que interferem na transferência de embriões em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 15-24, 2014.

GONZALEZ-BULNES, A.G; MORENO, J.S; BRUNET, A.G; SEBASTIAN, A.L. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 35, p. 65-68, Berlin, 2000.

GUSMÃO, A.L; ANDRADE MOURA, J.C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 29-33, 2005.

GUSMÃO, A.L; BISCARDE, C.E.A; KIYA, C.K. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 226-231, 2013.

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.137–157, 1997.

LOIOLA FILHO, J.B. 2013. **Efeito da dose de pfsh na produção *in vivo* de embriões em ovelhas dorper pertencentes a duas categorias de peso corporal**. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, Pernambuco.

LOPES JÚNIOR, E.S.; MAIA, E.L.M.M.; ALMEIDA, K.C.; PAULA, N.R.O.; TEIXEIRA, D.I.A.; RONDINA, D.; SELAIVE-VILLAROEL, A.B.; FREITAS, V.J.F. Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.510, 2006.

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

OKADA, A.; KAMADA, S.; JEON, C.W.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, p.397–402, 2000.

OLIVEIRA, M.E.F ; FONSECA, J. F. ; PIERONI, J. S. P. ; FERREIRA, R.M. ; CORDEIRO, M. F. ; SOUZA, S. F. ; TEIXEIRA, P.P.M ; Vicente, W. R. R. . Occurrence of subnormal corpus luteum in superovulated Santa Inês sheep using protocols with or without LH administrated at the end of the FSH treatment. In: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2009, São Paulo. **Animal Reproduction**, v. 6. p. 231-231, 2009.

OLIVEIRA, M.E.F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 29-35, 2011.

OLIVEIRA, M.E.F.; BARTLEWSKI, P.M.; FELICIANO, M.A.R. Controle do ciclo estral. In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M; VICENTE, W.R.R. (Eds). **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**, São Paulo: MedVet, p. 71-89, 2013b.

OLIVEIRA, M.E.F; FELICIANO, M.A.R.; D'AMATO, C.C.; OLIVEIRA, L.G.; SONY D.; BICUDO, S.D.; FONSECA, J.F.; VICENTE, W.R.R.; VISCO, E.; BARTLEWSKI, P.M.

Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.20-37, 2014.

OLIVEIRA, M.E.F; FONSECA, J.F; OLIVEIRA, L.G. Transferência de embrião. In: **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. Primeira edição. São Paulo: Editora MedVet, p.103-120,2013a.

OLIVEIRA, M.F.E. Fisiologia do ciclo estral. In: **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. Primeira edição. São Paulo: Editora MedVet, p.17-24,2013c.

OLIVEIRA, M.F.E; FELICIANO, M.A.R;. Ultrassonografia da Reprodução. In: **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. Primeira edição. São Paulo: Editora MedVet, p.121-146, 2013d.

RUBIANES, E.; UNGERFELS, R.; IBARRA, D. Serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. **Small Ruminant Research**, v.21, p.105-111, 1996.

SÁ FILHO, O.G & VASCONCELOS, J.L.M. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. **Revista veterinária e zootecnia**, v. 15, n.2, p. 220-233, 2008.

SAHARREA, A; VALENCIA, J; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, O; CERBÓN, J.L; CABALLERO, V; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**, v. 50, p. 1039-1052, 1998.

SALLES, H.O; SOARES, A.T; ANDRIOLI, A; SOBRINHO, P.A.M; AZEVEDO, H.C. Diferentes posologias de Funixin Meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. **Ciência Animal**, n. 8, v.2, p. 69-74, 1998.

SALLES, M.G.F; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução**, v. 34, p. 185-194, 2010.

SIMÕES, J. ALMEIDA, J.C; BARIL, G; AZEVEDO, J; FONTES, P; MASCARENHAS, R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 36-46, 2007.

SIQUEIRA, L.G.B; VIANNA, J.H.M; DINIZ, E.S; CAMARGO, L.S; AMORIM, L.S; FONSECA, J.F; FERNANDES, C.A.C; TORRES, C.A.A. Aferição de ecogenicidade

luteal com o uso de diferentes transdutores de ultra-som. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 01, v. 34, 2006.

STUBBINGS, R.B.; BOSU, W.T.R.; BAKER, C.A .V.; KING, G.J. Serum progesterone concentration associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, p.369-373, 1986.

STUBBINGS, R.B; WALTON, J.S. Relationship between plasma progesterone concentration and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or frozen embryos. **Theriogenology**, v. 26, p. 145-155, 1986.

WU, W.; HANIKEZI; YANG, M.; GONG, P.; WANG, F.; TIAN, Y.; XU, X.; FU, X. HAQIKEZI; TIAN, K.; GUO, Z. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.15834-15837, 2011.

CAPÍTULO 2 – Dinâmica de corpos lúteos em protocolos com redução da dose de FSH na superovulação em ovelhas

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dose de FSH exógeno no tratamento superestimulatório sobre a dinâmica de desenvolvimento e funcionalidade de corpos lúteos em fêmeas ovinas doadoras de embrião. Foram utilizadas 29 ovelhas Santa Inês, as quais foram submetidas à sincronização do estro com um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®), inserido no Dia 0, permanecendo até o Dia 8. Concomitantemente ao início do protocolo e retirada do dispositivo intravaginal foi administrado um análogo da PGF2 α . O tratamento gonadotrófico teve início 48 horas antes da retirada da progesterona (D6), quando as fêmeas foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais de acordo com a dose total de FSH suíno exógeno: G200 (controle, n=9) - 200 mg de FSH; G133 (n=10) - 133 mg de FSH; e G100 (n=10) - 100 mg de FSH. No D6 (1ª aplicação de FSH), as fêmeas receberam também 300 UI de eCG. As avaliações ultrassonográficas Modo-B e Doppler foram realizadas durante o período de luteogênese (D11) até o dia correspondente a videolaparoscopia (D15), com o propósito de acompanhar o desenvolvimento das estruturas lúteas (dimensões) e, posteriormente serem avaliadas de acordo com a caracterização do padrão de vascularização pelos índices de fluxo sanguíneo da artéria ovariana (VPS, VDF, IR e IP). A videolaparoscopia foi realizada com o propósito de avaliar macroscopicamente as características dos corpos lúteos formados e classificá-los em normais ou subnormais (regredidos prematuramente). A análise estatística foi realizada por meio do software R®, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. As ovelhas superovuladas com 100 e 133 mg de FSH apresentaram um aumento gradativo do diâmetro dos corpos lúteos com passar dos dias pós-ovulação ($p < 0,001$), diferentemente, os animais que receberam o tratamento de 200 mg de FSH apresentaram aumento do diâmetro entre os dias 11 e 13 e diminuição nos dias 14 e 15 ($p < 0,001$). As ovelhas expostas ao tratamento superestimulatório com 200 mg de FSH apresentaram maior percentual de RPCL (49,03) em relação as dos grupos tratados com 100 e 133 mg de FSH ($p < 0,001$). A VDF foi maior nas ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH um dia após as ovulações (D11) do que nas superovuladas com 100 mg de FSH ($p = 0,029$). O IR foi maior nas ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH do que quando superovuladas com 100 mg de FSH ($p = 0,02$). E o IP foi maior nos dias 14 e 15 do que nos demais dias avaliados ($p < 0,01$). Conclui-se que a ultrassonografia é uma ferramenta eficaz para acompanhar a dinâmica luteal em ovelhas superestimuladas e, as menores doses de FSH exógeno foram suficientes para uma eficiente resposta superovulatória em ovelhas, proporcionando menor custo no tratamento gonadotrófico de fêmeas doadoras de embriões.

Palavras-chave: dosagem FSH exógeno, superestimulação, luteólise prematura, ultrassom, ovino.

1. Introdução

A produção *in vivo* de embriões proporciona uma potente tecnologia para acelerar o melhoramento genético em pequenos ruminantes [2]. É inegável a importância dessa técnica na reprodução de animais, contudo, são necessários mais estudos para compreender as respostas aos tratamentos superovulatórios e a produção de embriões viáveis, para o incremento de eficiência.

Um dos entraves da produção *in vivo* de embriões é a regressão prematura do corpo lúteo (RPCL), que acontece antes do momento em que o endométrio inicia fisiologicamente a secreção pulsátil de PGF2 α em um ciclo estral [40], ou seja, antes da fase final do diestro. Embora a ocorrência seja de 75% em ovelhas superestimuladas [28,38]. Independente da gonadotrofina empregada, as causas da RPCL não estão completamente elucidadas, acredita-se que tal alteração na dinâmica ovariana e endócrina seja em virtude do uso de doses consideradas altas [24], as quais podem induzir estímulo prolongado sobre os folículos que, por sua vez, não ovulam (folículos anovulatórios ou persistentes) e permanecem produzindo estrógeno durante a fase lútea inicial, ocasionando desta maneira a liberação precoce de PGF2 α e regressão luteal [32].

Empregam-se comumente protocolos superovulatórios em ovinos com doses totais de 256 mg [36] ou 200 mg de FSH [39], enquanto em bovinos valores bem menores (100 ou 133 mg) são usuais, fato que indica a real necessidade de estudos que abordem o uso de doses menores de FSH em ovinos. São ainda escassos os registros na literatura de estudos neste sentido [52,27], tampouco há divulgação de resultados referentes aos efeitos sobre a dinâmica de desenvolvimento dos folículos, quiçá sobre o contexto da regressão prematura dos corpos lúteos.

O diagnóstico desta alteração de funcionalidade dos corpos lúteos requer confirmação pela concentração de progesterona plasmática abaixo de 1 ng/mL [11] e o emprego de técnicas que possibilitem a avaliação macroscópica de suas características, como laparotomia ou laparoscopia, as quais são consideradas invasivas. Apesar de não se ter estudos comprovando, acredita-se que outra ferramenta diagnóstica seria a avaliação histológica, entretanto, ainda mais invasiva. A eficácia deste método já foi comprovada para diferenciar estruturas funcionais a partir do sexto dia do ciclo estral com CL em estágio de regressão, entretanto, não

possibilitou diferenciá-las de estruturas em fase luteal inicial [6], sugerindo a dificuldade de diagnosticar RPCL.

Pelos métodos de detecção da RPCL apontados, denota-se o grande pleito por estabelecer ferramentas alternativas para o diagnóstico rápido, prático, eficiente e não invasivo. Acredita-se que a ultrassonografia seja o método mais viável para este fim, no entanto, não há estudos que comprovem como procedimento diagnóstico eficaz para a RPCL. Sabe-se que a ultrassonografia dos ovários é muito útil para detectar as estruturas ovarianas e acompanhar eventos como o desenvolvimento folicular e do corpo lúteo [37]. Diferenças em ecogenicidade e ecotextura destas estruturas já foram indicadas ao longo da fase luteal do ciclo estral em ovelhas [19]. A avaliação da função luteal por meio de análise de atributos das imagens ultrassonográficas também foi estudada em cabras [3] e, observou-se uma pequena correlação entre ecotextura do CL e função esteroidogênica, demonstrando o potencial limitado de diagnóstico ultrassonográfico da função luteal em caprinos. Vale destacar que os autores realizaram apenas a ultrassonografia convencional.

Recentemente, a ultrassonografia Doppler tem sido empregada com o objetivo de aprimorar os conhecimentos fisiopatológicos da reprodução, como por exemplo pelo estudo da vascularização de corpos lúteos [7,29]. Uma vez que, o sistema vascular dessas estruturas representa 50% das células que as constituem [42], a investigação neste âmbito apresenta extrema relevância.

Assim projeta-se que na RPCL seja possível detectar diferenças em relação às estruturas plenamente funcionais, tanto em dimensão quanto em índices de fluxo sanguíneo da artéria ovariana, a qual tem a função de irrigar e nutrir o corpo lúteo. Bem como, diferir as estruturas em plena funcionalidade (pela concentração sérica de progesterona abaixo de 1ng/mL e pelas características ultrassonográficas associadas à avaliação macroscópica por videolaparoscopia) e regredidas em ovelhas doadoras de embrião, as quais receberam diferentes doses de FSH exógeno (100, 133 e 200 mg) no tratamento gonadotrófico.

Neste contexto, objetivou-se aperfeiçoar a utilização de protocolos de FSH com doses reduzidas em ovinos, assim como, potencialmente definir ferramenta diagnóstica efetiva da qualidade e funcionalidade dos corpos lúteos pelo emprego da ultrassonografia.

2. Material e Métodos

2.1 Animais e local do experimento

Todo procedimento experimental foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brasil (protocolo nº12062/14).

Foram utilizadas 29 ovelhas da raça Santa Inês, sexualmente adultas (2 a 3 anos), pluríparas, não prenhes, não lactantes, com peso de 35 a 45 kg e, após a realização de exame clínico geral e ultrassonografia do aparelho reprodutor, consideradas híginas. Os animais foram mantidos em um piquete anexo ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus de Jaboticabal (21° 15’ 18” Sul e 48° 19’ 19” Oeste). Em sistema intensivo de criação, os animais tiveram acesso a sal mineral, água, silagem de milho *ad libitum* e ração balanceada a quantidade de 200 g/animal/dia. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em sala própria deste Departamento.

2.2 Protocolo hormonal

Todas as fêmeas foram submetidas a protocolos de superovulação (figura 1), os quais iniciados em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No dia inicial foi administrado 0,5 mL de um análogo da PGF α (Sincrocio®), por via intramuscular e introduzido um dispositivo intravaginal contendo 0,3g de progesterona (Eazi – Breed CIDR® - Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Nova Zelândia) para sincronização de estro, que permaneceu até o Dia 8 (D8). Concomitantemente à remoção do dispositivo administrou-se outra dose PGF α (0,5 mL de Sincrocio®) por via intramuscular.

No Dia 6 (D6) do protocolo iniciou-se o tratamento gonadotrófico (isto é, 48 horas antes da retirada do CIDR®). Neste momento, as fêmeas foram, inteiramente ao acaso, divididas em três grupos experimentais de acordo com a dose total de FSH suíno exógeno (Folltropin®, Bioniche, Canadá): G200 (controle, n=9) - 200 mg de FSH; G133 (n=10) - 133 mg de FSH; e G100 (n=10) - 100 mg de FSH. As doses totais foram administradas em 8 aplicações à intervalos de 12 horas (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5 e 5% de FSHp). No D6 (1ª aplicação de FSH), as fêmeas receberam também 300 UI de

eCG (Novormon®, Coopers, MSD, Brasil). A escolha das doses a serem testadas no presente estudo baseou-se no critério de melhor aproveitamento do fármaco de acordo com sua apresentação (400 mg de FSH em 20 mL). Assim, nos grupos G200, G133 e G100 foi possível utilizar um frasco para duas, três e quatro fêmeas, respectivamente. O período ovulatório se iniciou dia 9 (D9) à noite e terminou dia 10 (D10) de manhã.

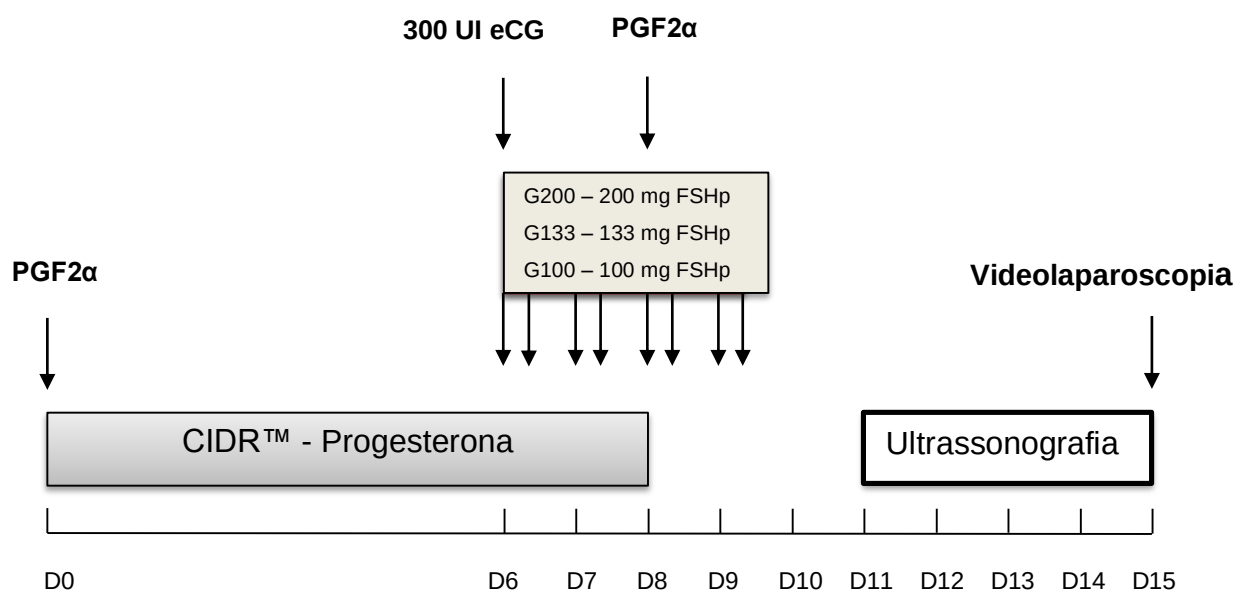


Figura 1 – Esquema ilustrativo do protocolo superovulatório utilizado durante o experimento. D0= início do protocolo superovulatório, D15= dia da videolaparoscopia (cinco a seis dias após as ovulações). G100= grupo de animais que receberam 100 mg de FSH, G133= 133 mg de FSH e G200= 200 mg de FSH. A avaliação ultrassonográfica das estruturas ovarianas (corpos lúteos e folículos anovulatórios) foi realizada durante o período luteal inicial. PGF2α=prostaglandina F2α; CIDR=implante de progesterona intravaginal; eCG=gonadotrofina coriônica equina.

2.3 Ultrassonografia

As avaliações ultrassonográficas (Modo-B e Doppler, colorido e espectral) dos corpos lúteos formados após os protocolos superovulatórios foram realizadas em todos os animais, a intervalos de 24 horas, durante o período correspondente a fase lútea inicial, entre os dias 11 (D11; equivalente ao início da luteogênese) e 15 (D15; correspondente ao dia da videolaparoscopia) dos protocolos. Os exames foram conduzidos com o propósito de acompanhar o desenvolvimento dos corpos lúteos formados através da mensuração de seus diâmetros, além de índices do fluxo sanguíneo das artérias ovarianas, até o dia da videolaparoscopia. Ademais, objetivou-se comparar os achados entre corpos lúteos considerados normais e aqueles corpos

lúteos que regrediram prematuramente. As características morfológicas foram confirmadas pela visualização videolaparoscópica, conforme detalhado na sequência.

Foi utilizado o aparelho ultrasonográfico MyLab Vet30 Gold (Esaote, Holanda) para a avaliação em Modo-B tempo real, Doppler colorido e Doppler espectral, com transdutor transretal linear multifrequencial (7,5 MHz) acoplado a um extensor para permitir sua manipulação externamente e, as configurações do ultrassom foram padronizadas. A metodologia de avaliação foi a mesma descrita em estudos anteriores [40].

Todos os corpos lúteos detectados pela ultrassonografia convencional foram quantificados e seus diâmetros mensurados (Figura 2), sendo assim identificados de acordo com seu posicionamento no ovário, de modo a permitir o acompanhamento de suas transformações diárias. O diâmetro de cada estrutura foi calculado pela equação: $D=(A+B)/2$; A - representa a máxima altura e B – o diâmetro transversal máximo.

A ultrassonografia Doppler Espectral foi realizada para avaliação de índices do fluxo sanguíneo das artérias ovarianas (Figura 3), representado por um traçado espectral, onde foi analisado o ponto máximo alcançado, chamado de velocidade de pico sistólico (VPS); o ponto mínimo da onda, chamado de velocidade diastólica final (VDF) e os índices de resistência vascular ($IR = [VPS-VDF]/VPS$) e pulsatividade ($IP = [VPS-VDF]/\text{velocidade média}$). O ângulo de insonância adotado foi entre 30° e 60°, de acordo com estudos anteriores [16].

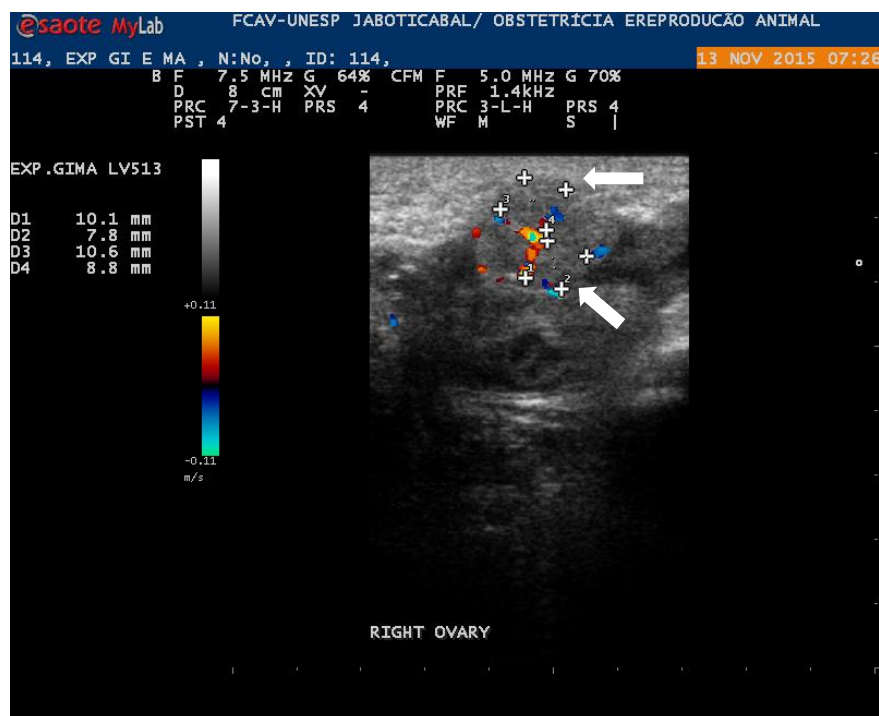


Figura 2 – Mensuração pela ultrassonografia, da altura máxima e do diâmetro transversal máximo dos corpos lúteos (em mm) de ovelhas superovuladas, durante o 15º dia (cinco à seis dias após a ovulação) do protocolo superovulatório.

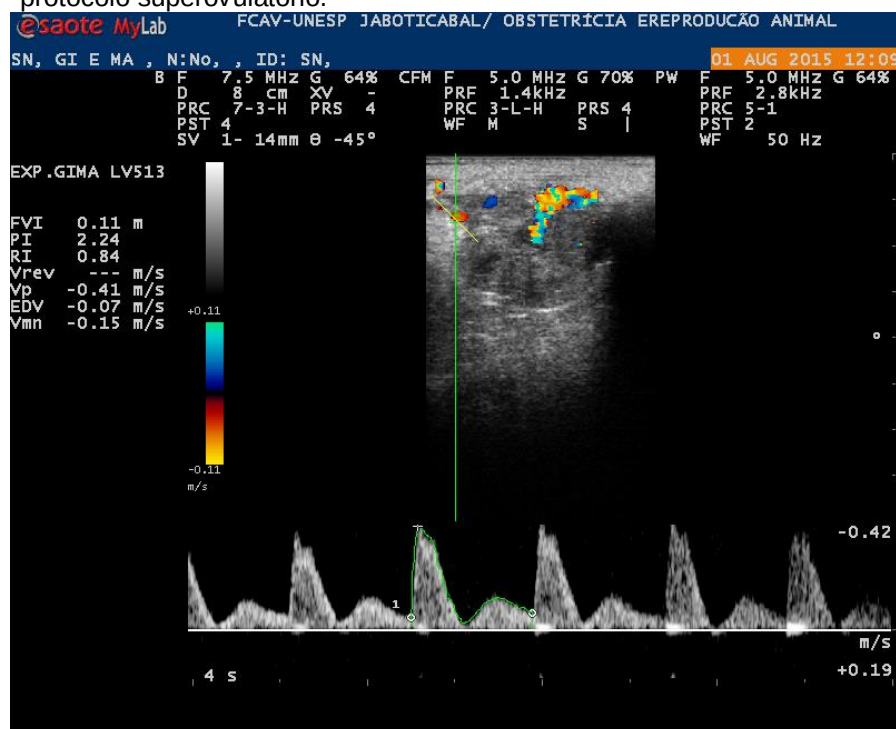


Figura 3 – Obtenção dos índices do fluxo sanguíneo (VPS, VDF, IR e IP) da artéria ovariana de ovelhas superovuladas, pela ultrassonografia doppler espectral. VPS=velocidade de pico sistólico; VDF=velocidade diastólica final; IR=índice de resistibilidade; IP=índice de pulsatividade.

2.4 Videolaparoscopia

No dia correspondente ao procedimento de colheita de embriões (cinco à seis dias após ovulação - D15) foram realizadas videolaparoscopias com o propósito de avaliar as estruturas ovarianas, sendo que folículos com diâmetro superior a 5 mm (folículos anovulatórios) e os corpos lúteos visualizados foram quantificados e classificados quanto a funcionalidade em normais e regredidos prematuramente (CLs pequenos < 5 mm, com coloração rosa pálida a acinzentado e com pouca ou nenhuma protrusão a partir da superfície do ovário) [34]. O procedimento de videolaparoscopia seguiu metodologia descrita por alguns autores em 2011 [36].

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software R® (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Os dados do diâmetro dos corpos lúteos e dos índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana foram comparados entre os tratamentos e os dias avaliados, por meio da análise de variância (ANOVA), com prévia comparação com Shapiro Wilk e teste de variância. O delineamento foi inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo e pós-teste de Tukey, para comparação das médias dos tratamentos, dos dias, e dos tratamentos em relação aos dias.

As taxas de corpos lúteos regredidos e não regredidos foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Qui-quadrado. Os parâmetros resultantes da avaliação ovariana durante o procedimento de videolaparoscopia foram comparados entre os tratamentos superovulatórios por meio do teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns. A significância para todos os testes foi fixada em 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

No presente estudo foi possível visibilizar os corpos lúteos das ovelhas submetidas aos protocolos de superovulação a partir de um dia pós-ovulação. Alguns autores encontraram dificuldade em identificar CLs nos primeiros dias após múltiplas ovulações em ovelhas [13, 51]. No entanto, já identificaram com maior eficácia os CLs em ovulações simples e duplas pela ultrassonografia Doppler em menos de um dia após as ovulações [15]. No presente estudo, não houve muita dificuldade, uma vez que os CLs foram avaliados não só pelo modo-B mas também pelo Doppler um dia após as ovulações, o que facilitou sua visualização pela vascularização detectada.

Com a associação da ultrassonografia modo-B e Doppler é possível visualizar CLs recém formados, contanto que esta técnica seja realizada por um profissional treinado, em um ambiente escuro e, com os animais devidamente adaptados ao exame.

Houve interação entre as doses de FSH e os dias de avaliação da dinâmica dos corpos lúteos (Tabela 1). Os animais tratados com 100 e 133 mg de FSH apresentaram um aumento gradativo do diâmetro dos corpos lúteos com passar dos dias pós-ovulação ($p < 0,001$), indicando uma evolução no desenvolvimento e na qualidade dos CLs. Estes achados corroboram com alguns autores [3,4], que observaram aumento progressivo na área luteal até o dia 9 do ciclo estral em cabras e, até o dia 6 após a ovulação em ovelhas. Diferentemente, os animais que receberam o tratamento de 200 mg de FSH apresentaram aumento do diâmetro entre os dias 11 e 13 e diminuição nos dias 14 e 15 ($p < 0,001$), o que indica o início do processo de luteólise desses CLs, uma vez que, o tamanho do CL tem uma correlação positiva com a concentração de progesterona e consequentemente sua qualidade [4].

No dia 12 do protocolo (dois dias após as ovulações), o diâmetro dos corpos lúteos foi maior nas ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH do que nas ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH e, o diâmetro dos CLs das ovelhas superovuladas com 100 mg não obteve diferença entre os todos os grupos ($p = 0,005$). A diferenciação celular e o crescimento inicial do CL depende obrigatoriamente do suporte de LH secretado pela adenohipófise [9,10], sugerindo neste estudo que as ovelhas do G133 podem ter recebido maior suporte de LH do que as do G200.

Nos dias 14 e 15 (quatro a cinco dias após as ovulações), o diâmetro dos corpos lúteos foi menor nas ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH ($p < 0,001$) em relação as fêmeas superovuladas com 100 e 133 mg de FSH. O CL de receptoras de embriões bovinos foi avaliado e verificaram que os diâmetros dos CLs não interferiram nas taxas de prenhez [26]. Estudo demonstra um decréscimo na área luteal de forma mais lenta e gradual do que a queda na concentração de progesterona durante a luteólise em cabras [3,4]. De acordo com o presente estudo pode-se sugerir que as ovelhas superovuladas com 100 e 133 mg de FSH tiveram maior capacidade em desenvolver as estruturas lúteas até o dia da videolaparoscopia, diferentemente dos animais que foram superovulados com 200 mg de FSH.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões dos diâmetros (em mm) de corpos lúteos de ovelhas submetidas à superovulação com 100 (G100), 133 (G133) e 200 (G200) mg de FSH, durante o início da luteogênese até o quinto dia após as ovulações.

	G100	G133	G200	Valor de P
D11	5,21±1,10 ^c	5,72±1,03 ^c	5,23±0,86 ^b	0,9
D12	6,10±1,40 ^{ABb}	6,41±1,17 ^{Ab}	5,67±1,04 ^{Bb}	0,005
D13	6,78±1,80 ^a	6,69±1,51 ^{ab}	6,43±1,32 ^a	0,9
D14	6,80±1,80 ^{Aa}	6,95±2,02 ^{Aab}	5,75±1,57 ^{Bb}	<0,001
D15	6,99±2,02 ^{Aa}	7,23±2,06 ^{Aa}	5,86±1,79 ^{Bb}	<0,001
Valor de	<0,001	<0,001	<0,001	

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos, e letras minúsculas entre os dias de avaliação. D=dia, sendo que o D0 corresponde ao início dos protocolos superovulatórios (inserção do dispositivo de progesterona), D11= um ou dois dia após as ovulações e, D15 ao dia da videolaparoscopia.

Em relação aos índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana, obtidos pela ultrassonografia Doppler espectral, não houve interação entre os tratamentos e os dias ($p=0,21$) para velocidade de pico sistólico (VPS). Este índice não diferiu entre os tratamentos ($p=0,56$) e, tampouco, entre dias da fase luteal ($p=0,50$).

Para a velocidade diastólica final (VDF) houve interação entre os tratamentos e os dias ($p=0,01$). No Dia 11, correspondente ao início da luteogênese, a VDF foi maior nas ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH do que naquelas superovuladas com 100 mg de FSH ($p=0,029$), enquanto, no grupo de ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH este índice foi similar aos demais grupos (Tabela 2). Fato que indica que a maior VDF no G133 corresponde a um maior suporte vascular de melhor capacidade e consistência para o ovário, proporcionando maior qualidade na formação dos CLs e na sua diferenciação celular, podendo-se correlacionar positivamente com o tamanho da estrutura.

Há descrição na literatura de que os índices vasculares, VPS e VDF, podem sofrer interferência do ângulo de insonância, uma vez que os vasos do sistema reprodutivo são tortuosos e de baixo calibre, o que pode influenciar no resultado. Por

outro lado, os índices de resistibilidade (IR) e pulsatividade (IP) parecem não sofrer interferência deste ângulo, sendo mais fidedignos os resultados [47,13].

Ademais, para obtenção de uma imagem de qualidade, a orientação do transdutor é fundamental, desta forma é indicado a preconização do ângulo de incidência dos feixes ultrassonográficos no fluxo das hemáceas entre 30°-60° [16], no presente estudo, foi realizada a padronização deste ângulo com o mesmo intervalo, contudo ainda pode-se questionar uma interferência devido a anatomia da artéria ovariana ser muito tortuosa [17]. Sugere-se então que a VPS tenha sofrido interferência do ângulo de insonância. Ainda não há estudos que comprovem uma relação positiva entre a VPS e o suporte vascular dos CLs em ovelhas.

Tabela 2 – Médias e desvios padrões da velocidade diastólica final (VDF) da artéria ovariana em relação aos dias (D) de avaliação ultrassonográfica (durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação, sendo que Dia 0 = início dos protocolos superovulatórios) e, em relação aos tratamentos superestimulatórios com 100 mg de FSH (G100), 133 mg de FSH (G133) e 200 mg de FSH (G200). Demonstrando a significância através do valor de P (<0,05).

	G100	G133	G200	Valor de P
D11	-0,04±0,06 ^b	0,02±0,07 ^a	-0,02±0,05 ^{ab}	0,029
D12	0,01± 0,07	-0,00±0,08	-0,01±0,08	>0,05
D13	0,01±0,06	-0,04±0,13	-0,01±0,06	>0,05
D14	-0,03±0,12	-0,01±0,05	-0,00±0,07	>0,05
D15	-0,05±0,11	-0,02±0,07	0,00±0,05	>0,05

Letras minúsculas indicam diferença entre os dias de avaliação. D=dia, sendo que o D0 corresponde ao início dos protocolos superovulatórios, D11= um ou dois dia após as ovulações e, D15 ao dia da videolaparoscopia.

Não houve interação do IR entre os tratamentos e os dias da fase luteal (p=0,19), porém diferiu entre os dias (p=0,02) e os tratamentos (p=0,02). Este índice foi maior quando os animais foram submetidos à superovulação com 200 mg de FSH do que aqueles superovulados com 100 mg de FSH (p=0,02), enquanto nas ovelhas que receberam 133 mg de FSH este índice foi similar aos demais tratamentos (Tabela 3).

Durante a luteólise, há liberação dos pulsos de $\text{PGF2}\alpha$, que induzem um aumento agudo no fluxo sanguíneo, seguido de diminuição do fluxo sanguíneo em detrimento da liberação local de peptídeos vasoativos e, conseqüentemente, vasoconstrição [5]. Estudos demonstram que o IR é maior em vacas durante o processo de luteólise [17], o que possibilita inferir uma relação negativa com a perfusão vascular do ovário das fêmeas superovuladas com 200 mg de FSH, ou seja, neste grupo o fluxo sanguíneo teve uma baixa capacidade em chegar ao ovário e nutrir os CLs, assim, tal fato pode estar relacionado com a maior ocorrência de RPCL neste grupo (Tabela 5). O período de regressão do corpo lúteo é acompanhado por uma diminuição progressiva do suprimento sanguíneo ovariano, com altos valores de IR e IP [17].

No dia 15, cinco a seis dias após as ovulações, observou-se que o IR foi maior que no dia 12, dois a três dias após as ovulações ($p=0,02$). Este resultado demonstra que o maior suporte vascular (menor resistibilidade) pode estar relacionado a luteogênese, pois a função dos fatores angiogênicos do corpo lúteo é principalmente nutrir-lo para promover funcionalidade e crescimento [5].

Estudos demonstram que o tratamento superovulatório induz um declínio progressivo no IP da artéria ovariana na fase luteal inicial em vacas superovuladas [23]. Neste estudo, não houve interação do índice de pulsatividade (IP) entre os tratamentos ($p=0,09$) e, nem entre os dias ($p=0,25$). Entretanto, este índice diferiu entre os dias ($p<0,001$), sendo que foi maior nos dias 14 e 15 do que nos demais dias avaliados ($p<0,01$). Sugere-se que não há correlação entre o IP da artéria ovariana com a qualidade dos corpos lúteos, ademais o IP não pode ser usado para prever a resposta superovulatória.

Tabela 3 – Médias e desvios padrões dos índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana em relação aos dias (D) de avaliação ultrassonográfica (durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação, em relação aos tratamentos superestimulatórios com 100 mg de FSH (G100), 133 mg de FSH (G133) e 200 mg de FSH (G200).

	VPS	IR	IP
D11	-0,07±0,26	0,74±0,12 ^{ab}	1,88±0,85 ^b
D12	-0,00±0,30	0,72±0,11 ^b	1,63±0,56 ^b
D13	-0,03±0,31	0,75±0,09 ^{ab}	1,83±0,53 ^b
D14	-0,08±0,29	0,77±0,09 ^{ab}	2,08±0,69 ^a
D15	-0,08±0,30	0,81±0,29 ^a	2,06±0,74 ^a
Valor de P	0,50	0,02	<0,01
G100	-0,04±0,29	0,74±0,12 ^B	1,77±0,70
G133	-0,04±0,28	0,75±0,10 ^{AB}	1,88±0,68
G200	-0,08±0,32	0,81±0,23 ^A	2,04±0,69
Valor de P	0,56	0,02	0,09

VPS: velocidade do pico sistólico; IR: índice de resistência; IP: índice de pulsatividade. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos, e letras minúsculas entre dias de avaliação (P<0,05). D=dia, sendo que o D0 corresponde ao início dos protocolos superovulatórios (inserção do dispositivo de progesterona), D11= um ou dois dia após as ovulações e, o D15 ao dia da videolaparoscopia.

Com a videolaparoscopia foi possível determinar o número de folículos anovulatórios, o número total de CLs, os números de CLs considerados normais e regredidos prematuramente, segundo critérios morfológicos já descritos [34], (Tabela 4). O número de folículos anovulatórios foi similar entre as ovelhas superestimuladas com 100, 133 e 200 mg de FSH (p=0,85), e sua ocorrência (média geral de 2,82±3,90)

foi similar aos registrados por alguns autores [36], que obtiveram $3,00 \pm 3,19$ folículos anovulatórios em ovelhas superestimuladas com 256 mg de FSH, e, inferior aos registros de outro autor, que observou $5,5 \pm 2,81$ folículos anovulatórios em ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH [10]. Elevadas concentrações de estrógenos secretados após a ovulação (durante a fase lútea), promove a ocorrência de folículos anovulatórios, condição que influenciam negativamente o rendimento dos programas de múltipla ovulação e transferência de embriões devido diminuição da taxa de fecundação dos oócitos, por influenciar negativamente no ambiente uterino, prejudicando o transporte dos espermatozoides [49]. Cabe destacar que no presente estudo a redução da dose total da gonadotrofina (FSH) no tratamento superovulatório não foi capaz de reduzir ou eliminar a ocorrência de folículos anovulatórios.

O número total de corpos lúteos (CLs) nas ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH ($15,00 \pm 6,50$) foi maior do que nas superovuladas com 133 ($9,30 \pm 3,71$) e 100 mg ($12,60 \pm 5,72$) de FSH ($p=0,04$). Estes achados são superiores aos registrados por outros autores, que obtiveram média de 4,63 corpos lúteos em ovelhas superovuladas com FSH [18]; Outros autores, observaram $10 \pm 2,5$ CLs em ovelhas superovuladas com FSH; $10,5 \pm 3,8$ de corpos lúteos em ovelhas superovuladas com 256 mg de FSH [20]; $12 \pm 6,48$ CLs em ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH [10]; $8,46 \pm 3,95$ CLs em ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH e, $8,14 \pm 3,34$ em ovelhas superovuladas com 133 mg de FSH [31]. Entretanto, o resultado do presente estudo foi inferior ao registrado por outro autor, o qual verificou $17,6 \pm 5,8$ CLs em ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH [27]. Apesar do maior número de CLs totais no grupo 200, grande parte destes CLs estavam macroscopicamente com características de regredidos no dia 15 (cinco à seis dias pós-ovulação), o que indica que não podemos considerar o número de CLs totais como um parâmetro para predizer a resposta superovulatória.

O número de corpos lúteos considerados normais foi significativamente maior quando se administrou a dose total de 100 mg de FSH para superovulação (Tabela 3), em relação às ovelhas que foram superovuladas com 133 e 200 mg de FSH ($p=0,04$). Fato que indica uma melhor resposta superovulatória no G100, por produzir CLs de maior capacidade de desenvolvimento com qualidade durante toda a fase lútea inicial; isto porque acredita-se que haja uma correlação positiva entre a qualidade dos CLs formados com a produção de embriões viáveis [28]

O número de corpos lúteos regredidos prematuramente foi maior nas ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH ($6,78 \pm 8,09$) do que nos demais tratamentos ($p=0,03$). Resultado inferior foi observado em outro estudo [34], $3,0 \pm 1,41$ corpos lúteos regrediram prematuramente em ovelhas superovuladas com 256 mg de FSH. Da mesma forma, foi observado $0,4 \pm 1,6$ de CLs em regressão em ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH, no entanto, observaram maior número de CLs em regressão em ovelhas superovuladas com 128 mg de FSH ($1,1 \pm 3,0$) em relação as que receberam 200 mg de FSH [27].

No presente estudo, a administração da maior dose de FSH (200 mg) na superovulação de ovelhas pode ter causado um estímulo prolongado sobre os folículos persistentes, os quais continuaram produzindo estrógeno durante a fase lútea inicial, promovendo a liberação precoce de $\text{PGF2}\alpha$ e consequentemente a RPCL [32]. Com redução da dose total de FSH de 200 para 133 e 100 mg para superestimulação ovariana em ovelhas foi observado menor número de CLs regredidos prematuramente, o que indica melhoria na resposta ao tratamento superovulatório, especialmente por se esperar que haveria efeitos favoráveis a produção de embriões quando utilizado as doses totais 100 e 133 mg de FSH.

Tabela 4 – Médias e desvios padrões do número de folículos anovulatórios, corpos lúteos (CLs) totais, CLs normais, CLs regredidos prematuramente, nas ovelhas superovuladas com 100 (G100), 133 (G133) e 200 (G200) mg de FSH exógeno, durante o período de luteogênese (D11 ao D15).

	G100	G133	G200	Valor de P
Nº folículos anovulatórios	$3,00 \pm 3,97$	$2,30 \pm 1,70$	$3,22 \pm 5,63$	0,85
Nº CLs totais	$12,60 \pm 5,72^{\text{AB}}$	$9,30 \pm 3,71^{\text{B}}$	$15,00 \pm 6,50^{\text{A}}$	0,04
Nº CLs normais	$10,10 \pm 7,52^{\text{A}}$	$6,50 \pm 4,77^{\text{B}}$	$8,22 \pm 8,60^{\text{AB}}$	0,04
Nº CLs regredidos prematuramente	$2,50 \pm 4,38^{\text{B}}$	$2,80 \pm 4,78^{\text{B}}$	$6,78 \pm 8,09^{\text{A}}$	0,03

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. D11= um ou dois dia após as ovulações, D15= cinco à seis dias após as ovulações.

A RPCL é comum em fêmeas superovuladas [12]. Foi observado RPCL em menos de 10% dos animais superovulados com 133 mg de FSH [10]; 15,80% de RPCL em ovelhas superovuladas com 200 mg de FSH e, 5,60% de RPCL nas fêmeas superovuladas com 133 mg de FSH [31]. A RPCL pode estar associada a concentrações plasmáticas elevadas de estrógeno durante a fase luteal inicial e baixas concentrações de progesterona entre o 3º- 5º dia do ciclo estral [14]. Este fenômeno é ressaltado como o grande obstáculo na produção de embriões, o que geralmente leva a uma baixa taxa de recuperação de embriões viáveis [41].

Os animais superovulados com 200 mg de FSH apresentaram maior taxa de corpos lúteos regredidos prematuramente (49,03%) em relação aos superovulados com 133 e 100 mg de FSH (Tabela 5), os quais apresentaram 31,48% e 19,04% de seus corpos lúteos regredidos prematuramente, respectivamente ($p < 0,001$). Estudos demonstram resultados inferiores: 21,4% de CLs regredidos prematuramente em relação ao número total de corpos lúteos, em ovelhas superovuladas com FSH [32]. E resultados superiores, como: 40% dos corpos lúteos regredidos prematuramente em ovelhas doadoras de embriões [46].

Esta alteração de funcionalidade lútea no presente estudo pode ser devido ao inadequado desenvolvimento dos folículos durante a fase folicular (como a ocorrência de folículos anovulatórios), ou pela ativação prematura do mecanismo luteolítico [33]. Todavia, as causas da RPCL ainda não estão bem elucidadas, podendo ser devido à falhas desde a fase folicular até a fase lútea. No presente estudo pode-se sugerir que o tratamento superovulatório com 100 mg de FSH produziu menor taxa de RPCL em relação aos demais tratamentos, o que conseqüentemente aumentou a eficácia da resposta superovulatória, gerando corpos lúteos de melhor qualidade.

Tabela 5 – Taxas de corpos lúteos regredidos prematuramente e corpos lúteos normais em relação aos grupos de ovelhas superovuladas com 100 (G100), 133 (G133) e 200 (G200) mg de FSH, durante o início da luteogênese até o quarto a quinto dia após a ovulação.

	CLs REGREDIDOS PREMATURAMENTE	CLs NORMAIS
G100	19,04% ^C	80,95% ^A
G133	31,48% ^B	68,51% ^B
G200	49,03% ^A	50,96% ^C
Valor de P	<0,001	<0,001

Taxa de corpos lúteos (CLs) regredidos prematuramente= número de corpos lúteos regredidos prematuramente/ número total de corpos lúteos. Taxa de corpos lúteos normais=número de corpos lúteos considerados normais/ número total de corpos lúteos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos.

4. Conclusão

A redução das doses de FSH exógeno de 200 mg para 133 e 100 mg empregadas no tratamento superovulatório em ovelhas asseguram a formação mais adequada de corpos lúteos e de melhor qualidade. Fato que permite a escolha da dose de 100 mg para o desenvolvimento de protocolos superovulatórios mais eficientes e de custo inferior em ovinos.

Referências

- [1] Acosta, TJ; Miyamoto, A. Vascular control of ovarian function: ovulation of corpus luteum formation e regression. *Animal reproduction science*, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- [2] Amiridis, GS; Cseh, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, n. 130, p. 152-161, 2012.
- [3] Arashiro, EK; Fonseca, JF; Siqueira, LGB; Fernandes, CA; Brandão, FZ; Oba, E; Viana, JH. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Ruminant Research*, aticle in press, 2010.
- [4] Arashiro, EK; Viana, JHM; Fonseca, JF; Camargo, LSA; Fernandes, CAC; Brandão, FZ. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. *Revista Brasileira de Zootecnia*, n. 9, v. 39, p. 1937-1942, 2010.
- [5] Ayres, H; Mingoti, GZ. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 13, v. 36, 174-180, 2012.
- [6] Baithalu, RK; Singh, SK; Gupta, C; Raja, AK; Saxena, A; Kumar, Y; Sinhg, R; Agarwal, SK. Cellular and functional characterization of Buffalo (*Buballus bubalis*) corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v. 140, p.138-146, 2013.
- [7] Barbosa, CC; Silva, LDM. Ultrassonografia Doppler para avaliação reprodutiva de fêmeas. *Revista brasileira de reprodução animal*, n. 4, v. 36, p. 220-224, Belo Horizonte, out/dez de 2012.
- [8] Bartlewski, PM; Baby, TE; Giffin, JL. Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, v. 124, p. 259-268, fevereiro de 2011.
- [9] Bertan, CM; Binelli, M; Madureira, EH; Traldi, AS. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. *Animal Science*, v. 43, n. 6, p. 824-840, São Paulo, 2006.

- [10] Brasil, OO. Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos. 2013. 69f. Dissertação (mestrado em ciências animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.
- [11] Cervantes, MJ; Juaréz, ML; Mejía, VO; Berruecos, VJM; Vera, AH; Valencia, J. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Animal Reproduction Science*, v.97, p. 47-54, 2007.
- [12] Dickie, AM; Paterson, C; Anderson, JLM; Boyd, JS. Determination of corpora lutea number in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, v. 51, p.1209-1224, 1999.
- [13] Ferreira, JC; Ignácio, FS; Meira, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during early gestation in mares: New concepts of evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 121, p. 281-283, 2010.
- [14] Fonseca, JF. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 65-70, 2006.
- [15] Figueira, LM. Análise de imagens ultrassonográficas em modo Doppler colorido na avaliação da função luteal em ovinos da raça Santa Inês. 83f. Dissertação de mestrado (clínica e reprodução animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.
- [16] Ginther, OJ; Utt, MD. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 24, p. 516-526, 2004.
- [17] Ginther, OJ; Santos, VG; Mir, RA; Beg, MA. Progesterone concentration when the future ovulatory follicle and corpus luteum are located in ipsilateral or contralateral ovaries in heifers. *Theriogenology*, v.79, p. 534-540, 2013.
- [18] Gomes, MGT. Influência do ambiente térmico e de diferentes dietas na superovulação e nos parâmetros fisiológicos de ovelhas Santa Inês. 243f. Tese de doutorado (Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

- [19] Gonzalez-Bulnes, AG; Moreno, JS; Brunet, AG; Sebastian, AL. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reproduction Domestic Animals*, v. 35, p. 65-68, Berlin, 2000.
- [20] González-Bulnes, A; García-García, RM; Santiago-Moreno, J; López-Sebastián, A; Cocero, MJ. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes by precense of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v. 58, p. 1607-1614, 2002a.
- [21] González-Bulnes, A; García-García, RM; Santiago-Moreno, J; Dominguez, V; López-Sebastián, A; Cocero, MJ. Reproductive Season affects inhibitory effects for large follicles on the response to superovulatory FSH treatment in ewes. *López-Theriogenology*, v. 60, p. 281-288, 2003.
- [22] González-Bulnes, A; García-García, RM; Castellanos, V; Santiago-Moreno, J; Ariznavarreta, C; Domínguez, V; López-Sebastián, A; Tresguerres, JAF; Cocero, MJ. Influence of maternal enviroment obtained in reponse to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod.Nutr.Dev*, v. 43, p.17-28, 2003.
- [23] Honnens, A; Niemann, H; Herzog, K; Paul, V; Meyer, HHD; Bollwein, H. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 113, p. 1-10, 2009.
- [24] Kafi, M.; McGowan, MR. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.48, p.137–157, 1997.
- [25] Koster, K; Nautrup, CP; Gunzel-Apel, ARA Doppler ultrasonographic of cyclic changes of ovarian perfusion in the beagle bitch. *Reproduction*, v.122, p. 453- 461, 2001.
- [26] Leal, LS; Oba, E; Fernandes, CAC; Sá Filho, OG. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 174-183, 2009.
- [27] Loiola Filho, JB. 2013. Efeito da dose de p_{fs}h na produção *in vivo* de embriões em ovelhas dorper pertencentes a duas categorias de peso corporal. 65f. Dissertação

(Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, Pernambuco.

[28] Lopes Júnior, ES.; Maia, ELMM.; Almeida, KC.; Paula, NRO.; Teixeira, DIA.; Rondina, D; Selaive-Villaroel, AB.; Freitas, VJF. Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). *Acta Scientiae Veterinariae*. v.34, p.510, 2006.

[29] Lüttgenau, J; Bollwein, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. *Reproductive biology*, v. 14, p.103 – 109, 2014.

[30] Miyamoto, A; Shirasuna, K; Shimizu, T; Matsui, M. Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants. *Reproductive biology*, n. 13, p. 272-278, 2013.

[31] Menezes, DCR. 2014. Avaliação de protocolos para superovulação ovina. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF.

[32] Okada, A; Kamada, S; Jeon, CW.; Miyamoto, A; Fukui, Y. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.397–402, 2000.

[33] Oliveira, MEF. Efeito da administração de LH ao final do tratamento superovulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça santa inês. 70f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

[34] Oliveira, MEF ; Fonseca, JF; Pieroni, JSP; Ferreira, RM. ; Cordeiro, MF; Souza, SF.; Teixeira, PPM ; Vicente, WRR. Occurrence of subnormal corpus luteum in superovulated Santa Inês sheep using protocols with or without LH administrated at the end of the FSH treatment. In: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2009, São Paulo. *Animal Reproduction*, v. 6. p. 231-231, 2009.

[35] Oliveira, MEF. Dinâmica folicular no uso em protocolos de Sincronização de estro e superovulação em Ovelhas santa inês. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2011.

- [36] Oliveira, MEF.; Cordeiro, MF. ; FERREIRA, RM. ; SOUZA, SF. ; PIERONI, JSP .; RODRIGUES, LFS ; FONSECA, JF. ; Vicente, WRR. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG. *Ciência Rural*, v. 42, p. 1077/6-1082, 2012.
- [37] Oliveira, MEF; Bartlewski, PM.; Feliciano, MAR. Controle do ciclo estral. In: Oliveira, MEF.; Teixeira, P.P.M; Vicente, WRR. (Eds). *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*, São Paulo: MedVet, p. 71-89, 2013a.
- [38] Oliveira, MEF; Feliciano, MAR;. *Ultrassonografia da Reprodução*. In: *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos*. Primeira edição. São Paulo: Editora MedVet, p.121-146, 2013b.
- [39] Oliveira, MEF; Feliciano, MAR.; D'Amatoa, CC; Oliveira, LG; Sony D; Bicudo, SD; Fonseca, J.F; Vicente, WRR; Visco, E; Bartlewski, PM. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.144, p.20-37, 2014.
- [40] Sá Filho, OG & Vasconcelos, JLM. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. *Revista veterinária e zootecnia*, v. 15, n.2, p. 220-233, 2008.
- [41] Salles, HO; Soares, AT; Andrioli, A; Sobrinho, PAM; Azevedo, HC. Diferentes posologias de Funixin Meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. *Ciência Animal*, vn. 8, v.2, p. 69-74, 1998.
- [42] Salles, MGF; Araújo, AA. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Revista Brasileira de Reprodução*, v. 34, p. 185-194, 2010.
- [43] Sangha, GK; Sharma, RK; Guraya, SS. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 43, p. 53-64, 2002.
- [44] Silveira, KBX. Superovulação com FSH ou PMSG para produção de embriões em ovelhas Suffolk durante o anestro sazonal. 58f. Dissertação de mestrado (Patologia Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- [45] Smith, G.W; Meidan, R. Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: Relevance to luteal regression. *Reproductive Biology*, 2014.

- [46] Schiewe, MC; Fitz, TA, Brown JL; Stuart LD; Wildt DE. Relationship of estrus synchronization method circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *Journal Reproduction Fertility*, v. 93, p. 19-30, 1991.
- [47] Silva, LA; Gastal, EL; Beg, MA; Ginther, OJ. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biology Reproduction*, v. 72, p. 755–761, 2005.
- [48] Smith, G.W; Meidan, R. Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: Relevance to luteal regression. *Reproductive Biology*, 2014.
- [49] Veiga-Lopez, A; Gonzalez-Bulnes, A; Tresguerres, JAF; Dominguez, V; Ariznavarreta, C; Cocero, MJ. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulatory sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, v.30, p. 76-87, 2006.
- [50] Viñoles, C; Meikle, A; Forsberg, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 69-79, 2004.
- [51] Vonnahme, KA; Redmer, DA; Borowczyk, E; Bilski, JJ; Luther, JS; Johnson, ML; Reynolds, LP; Grazul-bilska, AT. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F2 α – induced regression in sheep. *Research reproduction*, v. 131, p. 1115-1126, 2006.
- [52] Wu, W; Hanikezi, Yang, M; Gong, P; Wang, F; Tian, Y; Xu, X; Fu, X; Tian, K; Guo, Z. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. *African Journal of Biotechnology*, v.10, p.15834-15837, 2011.