

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE
CÉLULAS FOLICULARES NA FORMAÇÃO E
FUNCIONALIDADE DE CORPO LÚTEO DECORRENTE
DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM OVINOS

RENAN DENADAI

Botucatu – SP
Março 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE
CÉLULAS FOLICULARES NA FORMAÇÃO E
FUNCIONALIDADE DE CORPO LÚTEO DECORRENTE
DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM OVINOS

RENAN DENADAI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Titular Sony Dimas
Bicudo

Botucatu – SP
Março 2019

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.

Influência do transplante autólogo de células
foliculares na formação e funcionalidade de corpo lúteo
decorrente da aspiração folicular em ovinos / Renan
Denadai. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Sony Dimas Bicudo
Capes: 50504002

1. Folículo ovariano. 2. Corpo lúteo. 3. Ovino. 4.
Progesterona. 5. Ultrassonografia veterinária. 6.
Transplante autólogo.

Palavras-chave: Aspiração Folicular; Corpo Lúteo; Ovino;
Progesterona; Ultrassonografia.

Nome do Autor: Renan Denadai

Título: INFLUÊNCIA DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS FOLICULARES NA FORMAÇÃO E FUNCIONALIDADE DE CORPO LÚTEO DECORRENTE DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM OVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Titular Sony Dimas Bicudo

Presidente e Orientado

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professor Adjunto Doutor João Carlos Pinheiro Ferreira

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professor Adjunto Doutor Cezinande de Meira

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professor Assistente Doutor Anthony César de Souza Castilho

Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Professora Adjunta Doutora Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan

Departamento Patologia e Clínica

Universidade Federal Fluminense - UFF

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Mariane, minha querida esposa, que tanto amo, todos meus familiares, professores e em especial ao meu filho Joaquim o amor da minha vida”

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Mariane pelo carinho e amor.

A meu pai Benedito Sérgio e minha Mãe Mara pelo amor me oferecido durante toda a vida.

Ao meu orientador, Professor Sony, pela sabedoria e aconselhamento e por ser um exemplo como profissional nas áreas de ensino, pesquisa e medicina veterinária aplicada.

A Professora Eunice, por contribuir diretamente com o desenvolver da pesquisa e meu desenvolvimento como aluno, veterinário e professor.

Aos demais docentes, pós-graduandos e estagiários que colaboraram com a execução do projeto.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa da tese pela enorme colaboração no aperfeiçoamento do texto e ideias deste trabalho.

Todos os funcionários da FMVZ-Unesp-Botucatu, em especial os do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por ter auxiliado ao desenvolvimento deste trabalho por meio da concessão de bolsas de estudo.

FIGURAS

Pág.

- FIGURA 1 – Delineamento experimental, determinação da ciclicidade ovariana, tratamento hormonal, monitoramento ovariano durante o intervalo interovulatório. Grupo LOPU (LG, n=7), Grupo Reposição (RG, n=8) e Grupo Controle (CG, n=5). US = exame ultrassonográfico; MAP = acetato de medroxiprogesterona; Clo = cloprostenol; eCG = gonadotrofinas coriônica equina; LOPU = aspiração folicular guiada por laparoscopia; AGCT= transplante autólogo de células da granulosa; P4 = dosagem de progesterona; Ov=Ovulação; h = horas; ↓ aplicação ou ocorrência..... 40
- FIGURA 2 – A: Sonograma de corpo lúteo solido de animal do Grupo Controle, se apresentando como área circunscrita hipercóico em relação ao estroma ovariano. B: Sonograma de corpo lúteo, em animal do Grupo LOPU, com grande cavidade preenchida por conteúdo anecóico, e apresentando na periferia área com características ultrassonográficas de luteinização. C: Sonograma de corpo lúteo do Grupo Reposição com seta indicando a presença de botão hiperecóico projetado na cavidade lútea..... 44
- FIGURA 3 – Desenvolvimento lúteo a ultrassonografia e dosagem de progesterona plasmáticas do Grupo LOPU (LG), Grupo Reposição (RG) e Grupo Controle (CG), durante o intervalo interovulatório. A - Média do diâmetro dos corpos lúteos (DM) durante os dias do período de observações. B - Média da área individual dos corpos lúteos (LAI) durante os dias do período de observações. C - Média da área lútea total (LAT) durante os dias do período de observações. D - Média das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante o período de observações. LG: Grupo LOPU (linha tracejada), RG: Grupo Reposição (linha pontilhada), CG: Grupo Controle (linha continua), CL: Corpo Lúteo. Diferentes letras minúsculas indicam diferença nos valores entre os dias ($P<0,05$)..... 46

FIGURA 4 – A – Média $\pm$ DP do diâmetro dos corpos lúteos (DM) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. B - Média da área individual dos corpos lúteos (LAI) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. C - Média da área lútea total (LTA) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. D - Média das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. LG: Grupo LOPU, RG: Grupo Reposição, CG: Grupo Controle, LG>: Maior corpo lúteo do Grupo LOPU, LG<: Menor corpo lúteo do Grupo LOPU, RG: Maior corpo lúteo do Grupo Reposição, RG: Menor corpo lúteo do Grupo Reposição, CG: Grupo Controle, CL: Corpo Lúteo. Diferentes letras minúsculas indicam diferença nos valores entre os grupos ($P<0,05$)..... 47

FIGURE 7 – Experimental design: Determination of ovarian activity, hormonal treatment, monitoring of the luteal phase, pregnancy detection, and parturition of the ewe during the experimental period. US (ultrasound examination); MAP (medroxyprogesterone acetate); Clo (cloprostenol); eCG (equine chorionic gonadotropin); LOPU (Laparoscopic ovum pick-up); AI (artificial insemination); OIFT (oocyte intrafallopian transfer); P4 (progesterone concentration); PD (pregnancy detection); h (hours); ↓ application or occurrence..... 64

FIGURE 8 – A: Manipulation of the abdominal structures by laparocopy for the identification of uterus and ovaries. B: Follicle aspiration system inserted in the trocar for access to the abdomen. C: Introduction of the tom cat catheter in the interior of oviduct..... 65

TABELA 1 –Média±DP dos parâmetros reprodutivos avaliados durante o período entre a aspiração folicular ou ovulação e a ocorrência de nova ovulação em ovelhas dos grupos experimentais.....	44
---	----

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Capítulo 1	
1 Introdução.....	2
2 Revisão da literatura.....	3
2.1 Foliculogênese e desenvolvimento folicular.....	3
2.2 Corpo Lúteo.....	6
2.3 Técnicas de aspiração folicular.....	15
2.4 Aspiração folicular para indução da formação de Corpo Lúteo	17
3 Referências.....	18
Capítulo 2	
Avaliação estrutural e funcional de corpos lúteos decorrentes da aspiração dos folículos ovarianos e reposição das células da granulosa em ovelhas.....	35
Resumo.....	35
1 Introdução.....	36
2 Materiais e métodos.....	37
3 Resultados.....	43
4 Discussão.....	47
5 Referências.....	52
Follicular aspiration just before ovulation induces the formation of functional corpus luteum with ability to maintain pregnancies obtained by oocytes intrafallopian transfer and artificial insemination in sheep.....	59
Abstract.....	59
1 Introduction.....	60
2 Material and methods.....	62
3 Results.....	67
4 Discussion.....	68
5 Conclusion.....	70
6 References.....	70

Capítulo 3	Pág.
1 Considerações finais.....	77
2 Conclusão.....	79

DENADAI, R **Influência do transplante autólogo de células foliculares na formação e funcionalidade de corpo lúteo decorrente da aspiração folicular em ovinos**. Botucatu, 2019. 79p. Tese de Doutorado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os corpos lúteos (CL) formados em decorrência da aspiração folicular guiada por laparoscopia (LOPU) na espécie ovina, quanto ao desenvolvimento morfológico, funcionalidade e potencial de desenvolvimento gestacional. Foram realizados dois experimentos, em ambos o estro das ovelhas foi sincronizado utilizando dispositivo intravaginal de acetato de medroxiprogesterona por 14 dias, aplicação de 140 µg cloprostenol no quarto dia e retirada do dispositivo no décimo quarto dia com concomitante administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG). No Experimento I, 48 horas após a remoção do dispositivo realizou-se a LOPU dos folículos ovarianos em seis ovelhas (Grupo LOPU – LG), ou a LOPU associada com reposição de células em sete animais (Grupo reposição – RG) em cinco animais a ovulação foi espontânea (Grupo controle – CG). Foi realizada avaliação ultrassonográfica ovariana dos animais diariamente até o momento de uma nova ovulação e coleta de sangue para dosagem de progesterona (P4) plasmática a cada 48 horas até o decimo quinto dia. Os animais do LG ($1,7 \pm 0,5$) e RG ($1,4 \pm 0,5$) formaram mais CLs do que os animais do CG ($1,0 \pm 0,0$). A área lútea individual dos CLs foi menor no LG ($0,69 \pm 0,30 \text{ cm}^2$), em comparação ao RG ($0,79 \pm 0,25 \text{ cm}^2$) e CG ($0,85 \pm 0,32 \text{ cm}^2$). A área lútea total foi semelhante entre o LG ($1,2 \pm 0,4 \text{ cm}^2$) e RG ($1,1 \pm 0,5 \text{ cm}^2$), sendo ambas maiores que a do CG ($0,9 \pm 0,3 \text{ cm}^2$). A concentração de P4 plasmática não diferiu entre os grupos, ficando acima de dois ng/mL na fase estática de desenvolvimento dos CLs. No Experimento II, após 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal realizou-se a LOPU de todos os folículos ovarianos visíveis. Os complexos *cúmulus* oócito (COCs) obtidos foram avaliados por estereomicroscopia, um COC autólogo com expansão das células do *cúmulus*

foi transferido para o interior do oviduto de cada ovelha, ipsilateral ao ovário do maior folículo aspirado e inseminação artificial (IA) guiada por laroscopia no corno uterino do mesmo lado. Após as transferências dos oócitos e IA as fêmeas foram acompanhadas diariamente por ultrassonografia transretal e dosagem de P4 plasmática por 18 dias. Ocorreu a formação de 2 CLs em cada animal, estes apresentaram produção de P4 crescente em fase inicial, que se estabilizou em concentrações superiores a 2 ng/mL. Uma das ovelhas apresentou diminuição nas concentrações de P4 e redução da área lútea no final do período das observações. Duas ovelhas se apresentavam gestantes à ultrassonografia realizada 35 dias após a transferência dos oócitos, e os partos normais ocorreram aos 151 e 153 dias, respectivamente. A partir das informações dos dois experimentos conclui-se que a LOPU em momento pré-ovulatório leva a formação de CLs funcionais em ovelhas, que o procedimento leva a formação de CLs acessórios, a transferência autóloga de células foliculares leva ao incremento da área lútea, e os animais apresentam concentrações plasmáticas similares à ovelha com CL decorrente de ovulação espontânea, sendo possível o desenvolvimento de gestação normal.

Palavras-chave: Corpo Lúteo, Ovino, Aspiração Folicular, Ultrassonografia, Progesterona.

DENADAI, R **Influence of autologous follicular cell transplantation on the formation and functionality of corpus luteum due to follicular aspiration in sheep.** Botucatu, 2019. 79p. Tese de Doutorado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the *corpus luteum* (CL) formed as a result of laparoscopic ovum *pick-up* (LOPU) in the ovine, regarding the morphological development, functionality and potential of gestational development. Two experiments were carried out, in both of them, the oestrous of the ewes was synchronized using a 14-day intravaginal device of medroxyprogesterone acetate, 140 µg cloprostenol on the fourth day and withdrawal of the device on the fourteenth day with concomitant administration of equine chorionic gonadotrophin (eCG). In Experiment I, 48 hours after the removal of the device, was realized a LOPU of the ovarian follicles in six sheep (LOPU Group - LG), or LOPU associated with cell replacement in seven animals (Replacement Group - RG) was performed in five animals a ovulation was spontaneous (Control Group - CG). Ultrasonographic evaluation of the animals was performed daily until the time of ovulation and blood collection for progesterone plasma concentration (P4) every 48 hours until the 15th day. LG animals (1.7 ± 0.5) and RG (1.4 ± 0.5) formed more CLs than CG animals (1.0 ± 0.0). The individual luteal area of CLs was lower in LG ($0.69 \pm 0.30 \text{ cm}^2$), compared to RG ($0.79 \pm 0.25 \text{ cm}^2$) and CG ($0.85 \pm 0.32 \text{ cm}^2$). The total luteal area was similar between LG ($1.2 \pm 0.4 \text{ cm}^2$) and RG ($1.1 \pm 0.5 \text{ cm}^2$), both larger than CG ($0.9 \pm 0.3 \text{ cm}^2$). Plasma P4 concentration did not differ between groups, being above 2 ng / mL in the static phase of CLs development. In Experiment II, after 48 hours of withdrawal of the intravaginal device, LOPU of all visible ovarian follicles was performed. The oocyte cumulus complexes (COCs) obtained were evaluated by stereomicroscopy, an autologous COC with cumulus cell expansion was transferred into the ovary of each sheep, ipsilateral to the ovary of the largest follicle aspirated and artificial insemination (AI) guided by laparoscopy in the uterine horn

on the same side. After oocyte and IA transfer the females were monitored daily by transrectal ultrasonography and plasma P4 dosage for 18 days. The formation of 2 CLs occurred in each animal, which presented increased P4 production in the initial phase, which stabilized at concentrations higher than 2 ng/mL. One of the sheep presented a decrease in P4 concentrations and a reduction of the luteal area at the end of the observation period. Two sheep were pregnant on ultrasonography performed 35 days after oocyte transfer, and normal deliveries occurred at 151 and 153 days, respectively. From the information of the two experiments it was concluded that LOPU in the pre-ovulatory period leads to the formation of functional CLs in sheep, which leads to the formation of accessory CLs, the autologous transfer of follicular cells leads to the increase of the luteal area, and the animals present similar plasma concentrations to the sheep with CL due to spontaneous ovulation, being possible the development of normal gestation.

Key words: *Corpus Luteum*, Ovine, Laparoscopic ovum *pick-up*, Ultrasonography, Progesterone.

Capítulo 1

1 – Introdução

A ovinocultura vem ganhando destaque na pecuária nacional, não apenas pelo aumento na procura de carne de cordeiro, mas também devido a maior exigência do consumidor em relação à qualidade (DEMINICIS et al., 2008; RAINERI, SANTOS e GAMEIRO, 2014). Nesse contexto, técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas como ferramentas produtivas, auxiliando no melhoramento genético do rebanho, resultando em uma maior produção de animais de qualidade (FONSECA e SIMPLICIO, 2008; PARAMIO e IZQUIERDO, 2014; PARAMIO e IZQUIERDO, 2016). Visando um aumento no número de descendentes de fêmeas com alto valor genético, são empregadas as técnicas de múltipla ovulações associadas a transferência de embriões (MOET) (GUSMÃO, BISCARDE e KIYA, 2013) e produção *in vitro* de embriões (PIV) (TRALDI, 2009; PARAMIO e IZQUIERDO, 2016).

A utilização das fêmeas em programas de reprodução assistida depende da adequada formação do corpo lúteo (CL), em relação ao seu desenvolvimento e produção de progesterona (P_4), sendo este de extrema importância para manutenção dos índices de fertilidade (BARTLEWSKI et al., 2017). É descrito que a aspiração do fluido do folículo antral ovariano induz a da formação de um CL funcional em equinos (BOGH et al., 2000; HAYASHI et al., 2006; HAYNA et al., 2006; MOZZAQUATRO et al., 2010) e bovinos (MILVAE et al., 1991, O'HARA, 2012).

Em estudo realizado para avaliar a dinâmica folicular após aspiração folicular guiada por laparoscopia (LOPU) do folículo dominante seguido de tratamento superestimulatório, após 64 e 72 horas, Denadai e colaboradores (2017) observaram a presença de pequenas estruturas com aspecto ultrassonográfico semelhantes a CL, indicando a ocorrência de possível luteinização.

A partir da hipótese de que a aspiração folicular resulta na formação CLs funcionais, e que a reposição de células contidas no aspirado pode incrementar a funcionalidade da glândula, os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar a formação do CL na espécie ovina, a partir da LOPU num momento pré-ovulatório

mediante ultrassonografia e quantificação da concentração da P_4 plasmática; 2) Verificar os efeitos da reposição de conteúdo celular para o interior da cavidade folicular e sua influência no desenvolvimento do CL e produção de P_4 e; 3) Avaliar na ovelha a competência do eventual CL formado a partir da LOPU num momento pré-ovulatório em ovelhas em manter gestação.

2 - Revisão da literatura

2. 1 Foliculogênese e desenvolvimento folicular

As ovelhas são consideradas poliétricas estacionais de dia curto, apresentando atividade reprodutiva no período de outono e inverno, em decorrência da redução estacional do período de horas de luz por dia (ARENDT, 1998). Algumas raças ovinas, com origem próxima à regiões equatoriais, onde a variação do fotoperíodo é menos marcante do que nas regiões temperadas, apresentam comportamento reprodutivo poliétrico anual (SOUSA et al., 2015).

O comportamento de sazonalidade reprodutiva pode ser considerado um método contraceptivo natural (LINCOLN e SHORT, 1980), pois com a restrição da atividade reprodutiva, os nascimentos ocorrem em períodos do ano com maior disponibilidade de alimentos. Esta característica pode favorecer a lactação da fêmea e por consequência aumentar as chances de sobrevivência e de melhor desenvolvimento dos cordeiros (WAYNE et al., 1988).

Na espécie ovina, o ciclo estral apresenta duração média de 16 a 17 dias (GINTHER, KOT e WILTBANK, 1995; BARTLEWSKI et al., 1999; SEEKALLU et al., 2010; GALLIENNE et al., 2012; BARTLEWSKI et al 2017), no decorrer do qual, a cada quatro ou cinco dias ocorre o surgimento de um grupo de pequenos folículos antrais, levando, portanto à emergência de duas a quatro ondas de crescimento folicular durante cada ciclo, sendo mais frequente prevalência de três ondas (GINTHER, KOT e WILTBANK, 1995; SEEKALLU et al., 2010; BABY e BARTLEWSKI, 2011; TAKADA et al., 2012).

O ciclo estral na ovelha pode ser dividido em uma longa fase lútea que dura cerca de 12 a 14 dias e uma curta fase folicular com duração de três a cinco dias (BARTLEWSKI, BABY e GIFFIN, 2011; BARTLEWSKI et al., 2017). O

tempo de duração do ciclo estral pode ser maior quando ocorre um aumento no tempo de funcionalidade do CL (BARTLEWSKI et al., 1999), ou reduzido por processo de luteinização insuficiente e curta duração do CL, esta ocorrendo principalmente no primeiro cio após parto e no início do período reprodutivo após anestro sazonal (HUNTER, 2004).

A foliculogênese na ovelha inicia-se durante o desenvolvimento embrionário, logo após a diferenciação sexual. Trinta e cinco dias após a fecundação ocorre o início do processo de formação dos folículos ovarianos, que se caracteriza pela migração de células da linhagem germinativa que povoam as gônadas primordiais, dando origem às ovogônias. Estas células presentes na cortical dos ovários sofrem diversas divisões mitóticas (SAWYER et al., 2002). As ovogônias iniciam a divisão meiótica que dará origem ao gameta feminino, evoluindo até o diplóteno da prófase I e é circundado por uma única camada de células epiteliais achatadas, dando origem ao folículo primordial (LUNDY et al., 1999).

Ao nascimento o número de folículos antrais em ovelhas é considerado alto, apresentando grande variação entre as fêmeas. Esse elevado número de folículos antrais se sustenta entre quatro e oito semanas (RAWLINGS et al., 2003). Bartlewski, Beard e Cook (2002), mediante avaliação ultrassonográfica dos ovários de borregas entre quatro e 24 semanas, verificaram que o número de folículos entre a semana quatro e 16 se mantem constante. Na 16ª semana ocorre um pico no número de folículos, que voltam a ser constante entre a semana 18 e 22, apresentando um novo pico na semana 24. Entretanto, o diâmetro do maior folículo observado ao longo das semanas é maior em cada avaliação.

A ausência de ovulação em borregas pré-púberes pode estar relacionada a um mecanismo de *feedback* negativo exacerbado dos estrógenos (E₂) em relação a secreção do LH. Este mecanismo tende a reduzir próximo a puberdade, permitindo assim que o processo de crescimento final e ovulação ocorram (FOSTER e RYAN, 1979). O peso corporal é um dos principais fatores que interfere no início da puberdade, sendo que em ovelhas esse processo se

inicia entre 35 e 50 kg dependendo da raça e época do ano (BARTLEWSKI et al., 2002, EDWARDS et al., 2015).

Após a puberdade, o controle do ciclo estral se dá pela 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 hipófise. Estas duas gonadotrofinas atuam principalmente nos ovários, estimulando o desenvolvimento folicular e produção de E₂ e P₄ (MCNEILLY et al., 2001). Os oócitos, as células da teca e da granulosa possuem papel importante na regulação do desenvolvimento folicular, produzindo uma série de fatores de crescimento, em destaques os do sistema IGF, de ação autócrina e parácrina, sendo estes responsáveis pelo desenvolvimento na fase pré-antral, ou seja, um desenvolvimento independente de gonadotrofinas (SCARAMUZZI et al., 2011).

O FSH é essencial para o desenvolvimento folicular, estimulando o recrutamento e estimulando o crescimento inicial dos folículos antrais, até que se tornem responsivos ao LH, sendo capazes de ovular e dar origem a um CL funcional (VEGETTI e ALAGNA, 2006). Na espécie ovina, a dependência do folículo por gonadotrofinas ocorre a partir de um grau morfológico de 2 mm detectado por ultrassonografia, ocorrendo atresia em concentrações insuficientes das mesmas (DRIANCOURT, 2001). Mudanças nas concentrações de FSH durante o ciclo estral estão intimamente relacionadas ao surgimento de novas ondas de desenvolvimento folicular (BAIRD et al., 1991).

Esta gonadotrofina atua em receptores de membranas acoplados a proteína G, o FSHR, que está presente nas células da gônada feminina (ULLOA-AGUIRRE e ZARINAN, 2016). Estudos recentes demonstraram que em ovelhas o FSHR está presente em tecidos uterinos e placentários dependendo da fase do estro e gestação, sugerindo uma possível participação desta glicoproteína em outros eventos reprodutivos que não apenas a foliculogênese (GRAZUL-BILSKA et al., 2018). A inibina produzida pelo folículo tem papel regulador do ciclo estral fazendo *feedback* negativo na produção de FSH, levando os folículos subordinados, sem receptores para LH a entrarem em atresia (CAMPBELL, SCARAMUZZI e WEBB, 1995; GONZALEZ-BULNES et al., 2004).

Existem dois padrões distintos na secreção de LH, onde cada um modula uma diferente função no ciclo estral. O primeiro é um padrão de secreção tônica, onde pequenos pulsos do hormônio são produzidos durante todo o ciclo, sendo este importante principalmente para a esteroidogênese. Já o segundo padrão, consiste em pico que ocorre na fase folicular que é importante para o processo de ovulação e formação do CL (GOODMAN e INSKEEP, 2006). Em um ciclo estral natural, a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após o início das manifestações de estro em ovelhas (SOUZA et al., 1995). Na fase folicular, ou seja na ausência de P₄, o aumento do E₂ faz *feedback* positivo com os núcleos de secreção pré-ovulatória de LH, levando a um pico pré-ovulatório desta gonadotrofina (RAWLINGS e COOK, 1993).

Em ovelhas com o estro sincronizado utilizando dispositivos intravaginais de P₄, a ovulação ocorre em média entre 54 a 72 horas após a remoção do dispositivo (VILARIÑO et al., 2010; VILARIÑO, RUBIANES e MENCHACA, 2013), o início de manifestação do estro ocorre em média 35 horas após remoção do implante de P₄, e o pico de LH ocorreu em média após 39 horas. Em relação ao pico de LH, Soriano et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes ao comparar ovelhas que tiveram seu estro sincronizado a partir da utilização de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de P₄ por 12 ou 6 dias, observaram que o pico de LH ocorre em média entre 30 e 44 horas após a remoção da P₄.

2.2 Corpo Lúteo

Regnier de Graaf (1641-1673) descreveu pela primeira vez a formação de pequenas estruturas globulares em ovários de coelhas após o coito, que permaneciam ali até o parto. Neste contexto observou-se também que o número destas estruturas tinha relação com a quantidade de descendentes. Posteriormente, foi nomeado por Marcello Malpighi (1628-1694) como *Corpora lutea* ou corpo amarelo (apud NISWENDER et al., 2000).

O CL é uma glândula ovariana transitória responsável pela produção de P₄ que se desenvolve após o processo de crescimento, maturação, ruptura do folículo ovariano e liberação do oócito, originando-se das células da teca e da

granulosa (NISWENDER et al., 2000). Esta estrutura via produção hormonal é fundamental para a regulação do ciclo estral, desenvolvimento folicular, ovulação e manutenção da gestão inicial em ovinos (BARTLEWSKI, 2017).

Uma intensa e complexa vascularização está presente no CL sendo fundamental para seu rápido crescimento e função secretória (FIGUEIRA et al., 2015, PINTO et al., 2018). O desenvolvimento do CL e capacidade em produzir P4 dependem desta rede vascular (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004), sendo que o aumento no fluxo sanguíneo é fundamental para a esteroidogênese (KOBAYASHI et al., 2001). A angiogênese é dependente de fatores estimuladores e inibidores (BERISHA e SCHAMS, 2005), fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento dos fibroblastos, o fator de crescimento epidermal, o fator de crescimento semelhante à insulina-I e à angiopoietina (BERISHA e SCHAMS, 2005).

O CL é composto principalmente de dois tipos celulares com capacidade esteroidogênicas, as células luteínicas grandes (CLG) e células luteínicas pequenas (CLP), além de outros componentes celulares, fibroblastos, capilares e células do sistema imune (GEMMELL et al., 1976; KENNY, FARIN e NISWENDER, 1989). As CLP com diâmetro entre 12 e 20 μm se originam das células da teca.

As CLG com diâmetro $>20 \mu\text{m}$ têm origem a partir das células murais da granulosa, sendo esta a de maior capacidade secretória e responsável por uma elevada secreção basal de P4 (NISWENDER, 2002). Nas CLG o núcleo se apresenta esférico, já na CLP este se apresenta irregular. Na CLG é descrita a presença de retículo endoplasmático rugosos que está ausente no outro tipo celular (FARIN et al., 1986).—Os dois tipos celulares contribuem para o desenvolvimento do volume do CL, porém as CLG aumentam por hipertrofia e as CLP por hiperplasia (FARIN, SAWYER e NISWENDER, 1989). Os fibroblastos e capilares endoteliais também crescem em número, semelhante ao que acontece com as CLP, sendo que em algumas condições os fibroblastos podem se modificar em CLP (O'SHEA, CRAN e HAY, 1980).

O pico pré-ovulatório de LH é essencial para que ocorra o desenvolvimento adequado do CL. Na sua ausência ocorre uma diminuição no tamanho das células lúteas e fibroblastos, além de uma esteroidogênese diminuída com baixos níveis da P₄ circulante (FARIN, NETT e NISWENDER, 1990). As CLP e CLG possuem receptores para LH (LHR), porém quando estimuladas *in vitro* apenas as pequenas respondem com produção de P₄, sendo que as grandes mantêm uma produção basal independente da gonadotrofina (RODGERS, O'SHEA e FINDLAY, 1983, HOYER et al., 1984, RANDY et al., 2007).

Em novilhas tratadas com antagonista do GnRH em diferentes fases do ciclo de desenvolvimento do CL, observou-se que na fase de crescimento e estática do CL, ocorreu uma redução significativa nas concentrações de P₄ durante o ciclo estral. Porém, não foi observada alteração no tempo de viabilidade do CL, fato que foi associado a redução na secreção basal de LH, interferindo na atividade do CL (FIKE et al., 1997).

Nas células pequenas a produção aguda de P₄ ocorre pela ligação do LH ao LHR, um receptor acoplado a proteína G. Esta ligação por via da adenilciclase aciona um segundo mensageiro elevando as contrações de AMP cíclico (cAMP), a qual ativa a proteína kinase A (PKA) (HOYER, FITZ e NISWENDER, 1984). A ativação da PKA eleva a produção de P₄, aumenta a atividade da colesterol esterase, elevando a conversão de esteres de colesterol intracitoplasmáticos em colesterol, auxiliando no transporte do colesterol pelo citoplasma, a qual porém não está associada a um aumento na atividade do complexo p450. Já a ativação da proteínakinase C (PKC) inibe a esteroidogênese (WILTBank, DISKIN e NISWENDER, 1991).

Em estudo realizado com células luteínas *in vitro*, as CLP aumentaram a produção de P₄ quando estimuladas com cAMP. Já as CLG não alteraram os níveis de produção de P₄ (HOYER e NISWENDER, 1986). Quando utilizado um inibidor específico de PKA sobre as CLG, ocorre redução na produção de P₄ (DIAZ et al., 2002). A PKA estimula a esteroidogênese nas células grandes mas por um mecanismo diferente ao que o associado ao LHR/cAMP descrito nas CLP (BOGAN e NISWENDER, 2007).

Estudos realizados por Wiltbank, Belfiore e Niswende em 1993 apontam que *in vitro*, quando estimuladas com P4, as CLG aumentam a produção de P4 quando comparado à estimulação com cAMP, sendo que as CLP não respondem a estimulação com P4. Já o LH em meio contendo P4 é capaz de aumentar a produção de P4 nas CLP, porém não tem efeito nas CLG, demonstrando independência do LH pelas CLG e um possível mecanismo auto regulatório exercido pela P4 na estimulação de sua produção pelas CLG.

Na presença da PKA ocorre a fosforilação da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) (DYSON et al., 2008). A StAR ou STARD1 é uma proteína de 35 kDa contendo uma porção C-terminal com afinidade lipídica e uma porção N-terminal com afinidade a membrana mitocondrial externa (ELUSTONDO, P.; MARTIN e KARTEN, 2017). Esta proteína contribui com o transporte do colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial interna, onde o colesterol é convertido em pregnenolona por ação do complexo de enzimas do citocromo p450 (ARAKANE et al., 1996; ARAKANE et al., 1997).

As proteínas translocadoras (TSPO), antigamente nominadas como receptores benzodiazepínicos periféricos (ELUSTONDO, MARTIN e KARTEN, 2017), estão presentes em grande quantidade na membrana externa de mitocôndrias de células com função esteroidogênicas (PAPADOPOULOS e BROWN, 1995; LACAPERRE e PAPADOPOULOS, 2003; HAUET et al., 2005). A atividade da TSPO está associada a canais iônicos voltagem dependente, formando um complexo proteico que permite o transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna (MCENERY et al., 1992).

Células de leydig tumorais de ratos *in vitro* foram adicionadas de oligodesoxinucleídeos que inibem a síntese de TSPO. Esse tratamento levou a um acúmulo celular de StAR e bloqueou a produção de pregnenolona, demonstrando a importância do TSPO para que a StAR tenha sua atividade, sendo que na sua ausência o início da esteroidogênese é bloqueado (HAUET et al., 2005).

Como resultado da ação das enzimas P-450_{scc}, adrenodoxina e adrenodina redutase ocorre a quebra da cadeia lateral do colesterol dando

origem a pregnenolona, sendo esta transportada da mitocôndria para o retículo endoplasmático liso. A seguir, por ação da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, a pregnenolona é convertida em P₄, que passa a se difundir pela célula, não existindo evidência de grande acúmulo da P₄ no tecido luteínico (NISWENDER, 2002).

A melatonina exerce função esteroidogênicas *in vivo* no CL e *in vitro* em células da granulosa por até três dias elevando os níveis de P₄ (DUROTOYE, WEBLEY e RODWAY, 1997) e também ação antioxidante local, permitindo um adequado processo de ovulação e formação do CL (TAMURA et al., 2013). Receptores de melatonina estão presentes principalmente em CLG, e é descrita expressão de genes precursores de melatonina nas células lúteas (XIAO et al., 2018). Manca et al. (2013) descrevem que ovelhas que tiveram a glândula pineal removidas cirurgicamente, apresentam CLs menores e com produção de P₄ diminuída quando comparadas com ovelhas com a função pineal intacta.

Na ovelha o surgimento do CL ocorre três a quatro dias após a ovulação, inicialmente apresenta 60 mm² de área, cresce até por volta do nono dia atingindo 200 mm², mantendo essa área até sua completa regressão por volta do 14º dia (BARTLEWSKI et al., 1999). Pode ocorrer diferenças do diâmetro do corpo lúteo, em função da raça avaliada, refletindo em variações em sua área, podendo ser observado inicialmente CL com 30 mm² e atingindo até 90 mm² no seu máximo desenvolvimento (CONTRERAS-SOLIS et al., 2008). Durante o ciclo estral o CL passa por uma rápida fase de crescimento, uma fase estática e por fim a regressão (GALLIENNE et al., 2012).

As concentrações de P₄ plasmática ficam entre 4 e 6 ng/mL durante um ciclo estral nos casos em que não ocorra fertilização (BARTLEWSKI et al., 1999; CONTRERAS-SOLIS et al., 2009), CLs com áreas maiores nem sempre apresentam maiores produções de P₄, porém existe correlação entre volume lúteo e produção de P₄ (SHABANKAREH, HABIBIZAD extorqui, 2009).

As concentrações de P₄ e a área do CL variam em ovelhas com ovulação simples ou dupla, sendo que no caso de dupla ovulação observa-se área menores nos CL. Porém, quando somada à área das duas estruturas, obtém-se

uma área luteínica total maior, em função disto, é esperado uma maior concentração de P₄ em animais com dupla ovulação (SHABANKAREH, HABIBIZAD e TORKI, 2009). A concentração sérica de P₄ em fêmeas com gestação dupla é maior do que a com fetos únicos (GÜR et al., 2011).

A administração exógena de gonadotrofinas durante a fase luteínica inicial é capaz de aumentar a produção de P₄ por formação de CL acessórios (COLESON, et al., 2015). Fernandes et al. (2018) descrevem que tratamentos com gonadotrofina coriônica humana (hCG) e GNRH no quarto dia após a ovulação são capazes de levar a formação de CLs acessórios em ovelhas, sendo que o hCG induz a uma maior concentração de P₄.

Uma variação morfológica em relação ao CL é a presença de cavidades, quando presente denomina-se CL cavitário (PEREZ-MARIN, 2009). As cavidades podem ter diâmetros variados, reduzindo-se gradualmente à medida que o CL se desenvolve, chegando inclusive a desaparecer por completo (KASTELIC, PIERSON e GINTHER, 1990). Sua presença pode afetar a área luteínica total (GONZÁLEZ- BULNES et al., 2000), porém geralmente não afeta a produção de P₄ e consequentemente a fertilidade destes animais (HERNÁNDEZ et al., 2003).

Tolentino-Castro et al. (2015), compararam a presença de CLs cavitários entre ovelhas lanadas e deslanadas e demonstrou um percentual maior de estruturas com cavidades em ovelhas deslanadas, 50% contra 32% nas lanadas, indicando que possivelmente exista um fator genético associado a presença de CL cavitário em ovinos.

A PGF_{2α} produzida pelo endométrio de ovelhas não gestantes chega por um sistema circulatório de contracorrente aos ovários (EINER-JENSEN e HUNTER, 2005). Esse hormônio derivado do ácido araquidônico e com ação vaso constritora é capaz de induzir a luteólise (MO et al., 2018). Dois dias antes do pico de LH, devido a um aumento na concentração sérica de estrógeno (E₂), que é produzido nos folículos, eleva-se o número de receptores de ocitocina no endométrio, aumentando a produção de PGF_{2α} endometrial (FLINT e SHELDRIK, 1985; MANN e LAMMING, 2001). A administração exógena de

ocitocina na fase inicial de desenvolvimento do CL aumenta as concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e leva a regressão prematura do CL (WEEMS et al., 2014).

Na ovelha, o principal responsável pela produção de ocitocina relacionada à luteólise é o próprio CL (FLINT e SHELDRIK, 1985). A produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ inicia-se 12 dias pós-ovulação e leva a completa regressão do CL entre os dias 14 e 15 dias do ciclo estral (PEXTON, WEEMS e INSKEEP, 1975). No início do desenvolvimento o CL é mais resistente a $\text{PGF}_{2\alpha}$ sendo necessárias maiores dosagens para induzir a luteólise (SILVIA e NISWENDER, 1984).

Durante a luteólise inicial entre 12 e 14 dias no ciclo estral nas CLG, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ promove a ativação da PKC que inibe a esteroidogênese, diminuindo a produção de P4, promovendo um influxo de Ca^{++} que leva a morte celular programada. Um aumento na produção de ocitocina e ativação do COX-2 elevando a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ local na fase tardia, 15 dias após a ovulação ocorrem a luteólise morfológica, quando a ocitocina se liga as CLP aumentando o influxo de Ca^{++} e levando a apoptose (NISWENDER et al., 2007).

Outro mecanismo que pode estar envolvido na regressão do CL é a produção de di-hidrotestosterona. Este hormônio que tem origem à partir da ação da 5 α -redutase sobre a testosterona, é capaz de inibir a produção de P4 através do aumento da atividade de COX-2 e por consequência secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sendo importante na fase inicial de regressão do CL. Porém, não estimula apoptose das células luteínicas durante a fase tardia (XIAO et al., 2019).

As células do sistema imune presentes no CL têm ação importante durante o processo de luteólise induzido pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (TALBOTT et al., 2014; ATLI et al., 2018). Os CLs de bovinos obtidos por ovariectomia após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena, apresentaram rápida infiltração de polimorfos nucleados, sugerindo que a luteólise pode envolver uma resposta aguda inflamatória devido a rápida elevação no número de células do sistema imune (SHIRASUNA et al., 2012).

Diferente da $\text{PGF}_{2\alpha}$, a prostaglandina E (PGE), um vasodilatador, exerce função protetora em relação ao CL e é capaz de estimular a produção de P4,

prevenindo a perda embrionária precoce (WEEMS et al., 2010; LaPORTE et al., 2017). A PGE₁ e PGE₂ são capazes de inibir a luteólise precoce induzida por uma fonte exógena de ocitocina (WEEMS et al., 2014), sendo que ambas são capazes de impedir a redução de LHR nas células luteínicas. Porém, apenas a PGE₁ leva a um aumento na expressão do mRNA do LHR (WEEMS et al., 2010).

A P₄ produzida pelo CL é fundamental para o estabelecimento e a manutenção inicial da gestação (McCRACKEN, CUSTER e LAMSA, 1999). A presença do conceito no corno uterino ipsilateral ao CL é fundamental para manutenção da gândula, sendo que a regressão do CL que ocorre no ovário oposto causa ausência do embrião neste corno (MAPLETOFT, LAPIN e GINTHER, 1976).

O reconhecimento materno fetal na ovelha ocorre pela produção de *Interferon-tau* (IFNT) pelo embrião durante o período próximo a implantação (ROBERTS et al., 2008; ANTONIAZZI et al., 2013). Essa proteína atua de forma parácrina no endométrio reduzindo a expressão de receptores para E₂, consequentemente não ativa receptores para ocitocina impedindo a liberação da PGF_{2α} (SPENCER e BAZER, 1996; ROMERO et al., 2015).

Um pico de liberação de INTF na veia uterina (OLIVEIRA et al., 2008), e em lavados uterinos (ROMERO et al., 2015) no décimo quinto dia de gestação, demonstra que neste momento ocorre com maior intensidade da sinalização materno fetal. A administração exógena de INTF recombinante ovino através da veia jugular ou da veia uterina é capaz de proteger o CL de luteólise induzida por PGF_{2α} exógena, demonstrando que além da ação parácrina intrauterina o INTF exerce ação direta de proteção do CL (ANTONIAZZI et al., 2013). Essa ação endócrina do INTF está relacionada à expressão de genes relacionados à atividade antiviral do *Interferon* (ROMERO et al., 2015).

Em ovinos, além do CL a placenta também é responsável pela produção de P₄ gestacional. A sua produção que se inicia por volta do 55º dia de gestação (RICKETS e FLINT, 1980), sendo que aos 90 dias a P₄ placentária consegue manter a gestação sem a presença do CL, sendo que a partir deste momento a administração de PGF_{2α} e seus análogos não são capazes de interromper a

gestação (WEEMS et al., 1992). A P₄ se mantém elevada até por volta de 130 dias de gestação, reduzindo-se até o momento do parto (STABENFELDT, DROST e FRANTI, 1970). A placenta também é responsável pela produção de estradiol17-β, que vai se elevando até o fim da gestação (FINDLAY e COX, 1970).

Após o período gestacional e consequentemente anestro gestacional, é comum que ocorra na primeira ovulação a formação de um CL pequeno e que sua regressão seja precoce (COOPER et al., 1991). Por esse motivo, a primeira ovulação após esse período possui baixa fertilidade (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1982).

A ultrassonografia modo B e a dosagem hormonal são as principais ferramentas utilizadas para avaliar o CL quanto ao seu desenvolvimento morfológico e funcionalidade, fornecendo dados das diferentes fases de desenvolvimento, quantidade estruturas e função secretória. Esta abordagem possibilita o estudo da glândula durante o ciclo estral normal, estro induzido e múltiplas ovulações ovarianas (RAVINDRA et al., 1994; GINTHER, KOT e WILTBANK, 1995; GALLIENNE et al; 2012; FIGUEIRA et al. 2015; PINTO et al., 2018; OLIVEIRA et al; 2018).

A avaliação computadorizada das imagens obtidas na ultrassonografia modo B é uma tentativa de se estimar a funcionalidade do CL através da escala de cinza, ecogenicidade, granulação de pixels da imagem e ecotextura, gerando um algoritmo numérico capaz de prever a funcionalidade do CL (DAVIES et al., 2006). Este método apresenta uma alta correlação entre a área do CL no momento do desenvolvimento luteínico e durante a sua regressão com a concentração de P₄. Porém, durante a fase estática essa correlação não foi observada (GALLIENNE et al., 2012).

A ultrassonografia doppler (USDop) é outra forma indireta de se estudar a funcionalidade do CL, avaliando a vascularização da glândula e o fluxo sanguíneo (SINGH et al., 2003). Figueira et al. (2015) utilizaram a USDop para avaliação do desenvolvimento do CL em ovelhas Santa Inês. Um aumento gradual da vascularização local e um decréscimo durante o período de luteólise

foi observado, porém, a queda de P4 foi muito mais abrupta do que o decréscimo da vascularização.

Em ovelhas submetidas a tratamentos hormonais visando múltiplas ovulações, a avaliação via USdop se mostrou eficiente para avaliar a resposta ovariana no dia da coleta de embriões, dispensando a tradicional avaliação previa dos ovários por laparoscopia (PINTO et al., 2018). O diagnostico precoce de gestação é possível através da avaliação da vascularização do CL através do USdop aos 17 dias de gestação, onde em ovelhas não gestante a intensidade do fluxo sanguíneo no CL é consideravelmente menor do que naqueles gestantes (ARASHIRO et al., 2018).

A aspiração do fluido folicular, principalmente quando realizada na fase folicular e após o pico de LH, pode simular os eventos que ocorrem na ovulação e é capaz de levar a formação de um CL ativo e com produção de P4 em bovinos (MILVAE et al., 1991; HAYASHI et al., 2006) e equinos MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010).

2.3 Técnicas de aspiração folicular

A aspiração dos folículos ovarianos em animais domésticos pode ser realizada *in vitro* através de ovários obtidos de abatedouros ou por técnica de ovariectomia, ou ainda por métodos *in vivo*, utilizando laparotomia, laparoscopia ou aspiração transvaginal guiada por ultrassom (ARMSTRONG, KOTARAS e EARL, 1997). A aspiração folicular é uma técnica comum e rotineira nos rebanhos bovinos visando a obtenção de complexo cúmulos oócito (COC) para produção *in vitro* (PIV) de embriões (da SILVA et al., 2017; CAVALIERI et al., 2018, ZACARIAS et al., 2018).

Em ovinos, a aspiração folicular guiada por laparoscopia (Laparoscopic Ovum Pic-Up - LOPU) é a ferramenta biotecnológica que apresenta os melhores resultados para obtenção de COCs, destinados à produção *in vitro* de embriões, clonagem e transgenia. A técnica em ovinos é um excelente modelo experimental para a aplicação de biotécnicas da reprodução em humanos (STANGL et al., 1999; BALDASSARRE et al., 2002).

Em 1974, Snyder e Dukelow 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).

A técnica de aspiração folicular consiste na inserção de três trocáteres na região abdominal, sendo um para inserção da ótica do laparoscópico para a visualização das estruturas do aparelho reprodutor, e os outros dois para inserção das pinças de manipulação e sistema de aspiração folicular. Através de uma bomba de aspiração gera-se vácuo no sistema, fazendo assim a condução do fluido folicular contendo os COCs até um recipiente para que posteriormente possam ser avaliados (BALDASSARRE et al., 1994; DENADAI et al, 2017).

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; WIECZOREK, KOSENIUK e CEGLA, 2018). Teixeira et al. (2011), avaliaram cortes histológicos de ovários de ovelhas que foram submetidas a LOPUs consecutivas, não encontrando evidências de alteração no tecido ovariano que pudessem sugerir um prejuízo a fertilidade futura dos animais.

Devido à pequena probabilidade de proporcionar alterações nas estruturas do trato reprodutivo que possam levar a redução da capacidade fertilizante, quando comparada a outras formas de obtenção de oócitos, e possibilitar colheitas repetidas elevando a produção de COCs, a LOPU se consolidou como a técnica mais indicada para a aspiração folicular na espécie ovina (COGNIÉ, 1999; STANGL et al., 1999; DENADAI et al., 2017; WIECZOREK, KOSENIUK e CEGLA, 2018).

2.4 Aspiração folicular para indução da formação de Corpo Lúteo

Além de ser utilizada com a finalidade de obtenção de oócitos, a aspiração folicular pode servir como ferramenta para manipulação do ambiente ovariano, controlando a população folicular (BERGFELT et al., 1994; STUBBINGS et al., 1995; HONPARKHE et al., 2014; DENADAI et al., 2017; GHETTI, et al., 2016) ou induzindo a formação de um CL (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010; O'HARA et al., 2012).

Como o folículo dominante interfere negativamente nos tratamentos superestimulatórios, a aspiração folicular foi utilizada em vacas como estratégia para sua remoção visando melhores taxas de recuperação embrionária (BERGFELT et al., 1997; OTOI et al., 1998; BARACALDO et al., 2000; SHAW e GOOD, 2000; AMIRIDIS et al., 2006).

Para controlar a população folicular, aplicou-se a aspiração folicular visando a sincronização da emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular, propondo uma sincronia nos eventos do ciclo estral em bovinos (BERGFELT et al., 1994; BURATINI et al., 2000), bubalinos (HONPARKHE et al., 2014), equinos (BERGFELT et al., 2007) ovinos (VALASI et al., 2013) e cervos (McCORKELL, WOODBURY e ADAMS, 2008).

É possível a indução da formação do CL por aspiração do folículo dominante em equinos (HINRICHS, RAND e PALMER, 1991, BRACHER et al.; 1993; BOGH et al., 2000; HAYNA et al., 2006; MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010). Porém, sua luteinização é menos comum se o procedimento for realizado durante a fase luteínica (BOGH et al., 2000) ou durante o período de transição (ALVARENGA, MCCUE, E FRANZ, 1999).

É descrita uma correlação positiva entre o tamanho do folículo aspirado e a área do CL formada, ou seja, quanto maior o folículo maior a área lútea, sendo que CLs maiores apresentaram maiores concentrações sistêmicas de P4 (HINRICHS, RAND e PALMER, 1991; BOGH et al., 2000; HAYNA et al., 2006; MONTECHIESI, 2009).

Em bovinos, Milvae et al. (1991) ao comparar a formação lútea a partir da aspiração folicular, com remoção das células ou com reposição das células, observaram grande diferença na produção de P₄ entre os CL formados. Quando houve remoção das células, as concentrações de P₄ não ultrapassaram 1 ng/dL, e nos animais onde foi efetuada reposição a concentração foi próxima a de um CL natural.

A área, diâmetro, volume e peso de CLs oriundos da aspiração folicular em vacas é menor do que aqueles oriundos de uma ovulação natural aos 14 dias de desenvolvimento (O'HARA et al., 2012). É descrita também diferença em relação ao desenvolvimento dos CLs quando os folículos são aspirados antes ou depois do pico de LH (HAYASHI et al., 2006).

Em ovelhas submetidas à LOPU durante a fase luteínica do ciclo estral, nos dias 4, 9 e 14 ao estudo ultrassonográfico observou-se a formação de folículos contendo coágulos sanguíneos, porém não foi descrita a formação de CLs ou aumento na produção de P₄ (VALASI et al., 2013). Denadai et al. (2017) observaram a formação de pequenas estruturas com características de CL a ultrassonografia, após a aspiração folicular de todos os folículos ovarianos associadas a tratamento com eCG e FSH.

3 - Referências

- ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p. 759-767, 2003.
- ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M.; FRANZ, L.C. Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. **Theriogenology**, v.51, p. 431, 1999.
- AMIRIDIS, G.S.; TSILIGIANNI, T.; VAINAS, E. Follicle Ablation Improves the Ovarian Response and the Number of Collected Embryos in Superovulated Cows During the Early Stages of Lactation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 402–407, 2006.
- ANTONIAZZI, A.Q.; WEBB, B.T.; ROMERO, J.J.; ASHLEY, R.L.; SMIRNOVA, P. N., HENKES, L.E.; BOTT, R.C.; OLIVEIRA, J.F.; NISWENDER, G.D.; BAZER, F.W.; HANSEN T.R. Endocrine Delivery of Interferon Tau Protects the Corpus Luteum from Prostaglandin F₂ Alpha-Induced Luteolysis in Ewes. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1- 12.
- ARAKANE, F.; NISHINO, S.H.; LIU, Z.; HOLT, J. A.; PAIN, D.; STOCCO, D. M.;

MILLER, W. L.; STRAUSS J. F Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 93, p. 13731–13736, 1996.

ARAKANE, F.; KING, S. R.; DU, Y.; KALLEN, C. B.; WALSH, L. P.; WATARI, H.; STOCCO, D. M.; STRAUSS, J. F. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 32656–32662, 1997.

ARASHIRO, E.K.N.; UNGERFELD, R.; CLARIGET, R.P.; PINTO, P.H.N.; BALARO, M.F.A.; BRAGANÇA, G.M.; RIBEIRO, L.S.; FONSECA, J.F.D.; BRANDÃO, F.Z. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularization using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology**, v. 106, p. 247-252, 2018.

ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p.13-22, 1998.

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. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 333-339, 1997.

ATLI, M.O; KOSE, M; HITIT, M.; KAYA, M.S.; BOZKAYA, F. Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F2a-induced luteolysis, **Theriogenology**, v. 111, p. 25-33, 2018.

BABY, T.E.; BARTLEWSKI; P.M. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. **Reproductive Biology**, v. 11, p. 19-36, 2011.

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.; 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.

BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle

Theriogenology; v. 53, p. 1239-1260, 2000.

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

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 37-44, 2002.

BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 259–268, 2011.

BARTLEWSKI P.M.; SOHAL, J.; PARAVINJA, V.; BABY, T.; OLIVEIRA, M.E.F.; MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; ZIEBA, D.A.; KEISLER, D.H. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep? **Domestic Animal Endocrinology**, v. 58, p. 30–38, 2017.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p.305-317, 2005.

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.

BERGFELT. D.R.; BO, G.A.; MAPLETOFT, J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 1 – 12, 1997.

BERGFELT. D.R.; MEIRA, C.; FLEURY, J.J.; FLEURY, P.D.C.; DELL'AQUA, J.A.; ADAMS, G.P. Ovulation synchronization following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 1183–1191, 2007.

BOGH, I.B.; HOIER, R.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. **Theriogenology**, v. 54, p. 877–888, 2000.

BOGAN, R.L; NISWENDER, G.D. Constitutive Steroidogenesis in Ovine Large Luteal Cells May Be Mediated by Tonically Active Protein Kinase A. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 209–216, 2007.

- BRACHER, V.; PARLEVLIET, J.; FAZELI, A.R.; PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M., DIELEMAN, S.J.; TAVERNE, M.A.M., COLENBRANDER, B. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 75–78, 1993.
- BURATINI, J.J.; PRICE, C.A. VISINTIN, J.A.; BO, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.
- CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R.J. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p.335-350, 1995.
- COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**; v. 51, p. 105-116, 1999.
- COLESON, M.P.; SANCHEZ, N.S.; ASHLEY, A.K.; ROSS, T.T.; ASHLEY, R.L. Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. **Reproduction**, v. 150, p. 43-52, 2015.
- CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G.; CAIGUA, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 47–55, 2008.
- CONTRERAS-SOLIS, I.; VASQUEZ, B.; DIAZ, T.; LETELIER, C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 384–392, 2009.
- COOPER, D.A; CARVE, R.D.A.; VILLENEUVE, P.; SILVIA, W.J.; INSKEEP, E.K. Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 411–421, 1991.
- CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; GUSZKIEWICZ, A.; KOSSAKOWSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lamb after in vitro maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 34-38, 1991
- DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C.

Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p.165–75, 2006.

DEMNICIS, B.B.; LIMA, L.C.O.; ARAÚJO, S.A.C; LUNGA, L.; BLUME, M.C. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **Pubvet**, v. 2, p.1-19, 2008

DENADAI, R.; LEITE, H.R.; BICUDO, L.C.; RODELLO, L.; OBA, E.; BICUDO, S.D. Pattern of follicular development in sheep subjected to ovarian superstimulation after follicular ablation by laparoscopic ovum pick-up. **Ciência Rural**, v. 47, e20150704, 2017.

DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; RABOT, A.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2a production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-80, 2002.

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

DUROTOYE, A.; WEBLEY, G.E.; RODWAY, R.G. Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 87-91, 1997.

DYSON, M.T.; JONES, J.K.; KOWALEWSKI, M.P.; MANNA, P.R.; ALONSO, M.; GOTTESMAN, M.E.; STOCCO, D.M. Mitochondrial A-Kinase Anchoring Protein 121 Binds Type II Protein Kinase A and Enhances Steroidogenic Acute Regulatory Protein-Mediated Steroidogenesis in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells, **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 267–277, 2008.

EDWARDS, S.J.; JUENGEL, J.L.; O'CONNELL, A.R.; JOHNSTONE, P.D.; FARQUHAR, P.A.; DAVIS, G.H. Attainment of puberty by ewes in the first year of life is associated with improved reproductive performance at 2 years of age. **Small Ruminant Research**, v. 123, 118–123, 2015.

EINER-JENSEN, N.; HUNTER, R.H.F.; Counter-current transfer in reproductive biology. **Reproduction**, v. 129, p. 9–18, 2005.

ELUSTONDO, P.; MARTIN, L.A.; KARTEN, B. Mitochondrial cholesterol import. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1862, p. 90–101, 2017.

FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; SAWYER, H.R.; GAMBONI, F.; NISWENDER,

G.D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1299–1308, 1986.

FARIN, C.E.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 181–187, 1989.

FARIN, C. E.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Effects of luteinizing hormone on luteal cell populations in hypophysectomized ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 61–70, 1990.

FERNANDEZ, J.; BRUNO-GALARRAGA, M.M.; SOTO, A.T.; de la SOTA, R.L.; CUETO, M.I.; LACAU, I.M.; GIBBONS, A.E. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*, v. 105, p. 184-188, 2018.

FIGUEIRA, L.M.; FONSECA, J.F.; ARASHIRO, E.K.N.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; RIBEIRO, A.C.S.; OBA, E.; VIANA, J.H.M.; BRANDÃO, F.Z. Colour doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 643–650, 2015.

FIKE, K.E.; BERGFELD, E.G.; CUPP, A.S.; KOJIMA, F.N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M.E.; GROTHAN, W.H.; HAMERNIK, D.L.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Gonadotropin secretion and development of ovarian follicles during oestrous cycles in heifers treated with luteinizing hormone releasing hormone antagonist. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 83-100, 1997.

FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L. Continuous infusion of oxytocin prevents induction of uterine oxytocin receptor and blocks luteal regression in cyclic ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p.623–31, 1985.

FINDLAY J.K.; COX, R.I. Oestrogen in the plasma of the sheep fetus. **Journal of Endocrinology**, v.46, p. 281–286. 1970

FONSECA, J. F.; SIMPLICIO, A. A. Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos. In: **Encontro internacional da pecuária da amazônia**, 1., 2008, Belém. Anais Belém: Instituto Frutal, 2008.

FOSTER, D.L.; RYAN, K.D.; Endocrine mechanisms governing transition into adult-hood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. **Endocrinology**, v. 105, p. 896–904, 1979.

GALLIENNE, J.; GREGG, C.; LEBLANC, E.; YAAKOB, N.; WU, D.; DAVIES, K.;

RAWLINGS, N.; PIERSON, R.; DEARDON, R.; BARTLEWSKI, P. Correlations between ultrasonographic characteristics of corpora lutea and systemic concentrations of progesterone during the discrete stages of corpora lutea lifespan and secretory activity in cyclic ewes. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 237, p. 509-515, 2012.

GEMMELL, R.T.; STACY, B.D.; THORBURN, G. D. Morphology of the Releasing Corpus Luteum in the Ewe. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 270-279, 1976.

GHETTI, A.M.; SIQUEIRA, L.G.; ARASHIRO, E.K., PALHAO, M.P.; BRANDAO, F.Z.; VIANA, J.H.; Characterization of blood flow and the effects of exogenous estradiol benzoate on residual follicles formed after ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration in cattle. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, p. 7-59, 2016.

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.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO, J. M.; GÓMEZ, B. A.; LÓPEZ, S.A. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 35: p. 65-68, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; SOUZA, C.J.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 107-19, 2004.

GOODMAN, R.L.; INSKEEP, E.K. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. In: **Neill JD, ed. Knobil and Neill's physiology of reproduction**, 3rd ed. Elsevier: Amsterdam, p. 2389–2447, 2006.

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

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYAZ, A.; VALKOV, V.; DORSAM, S.T.; REDMER, D.A. Follicle stimulating hormone receptor protein is expressed in ovine uterus during the estrous cycle and utero-placenta during early pregnancy: An immunohistochemical study. **Acta Histochemica**, v. 120, p. 420-428, 2018.

GÜR, S.; TÜRK, G.; DEMIRCI, E.; YÜCE, A.; SÖNMEZ, M.; OZER, S.; AKSU, E.

Effect of pregnancy and foetal number on diameter of corpus luteum, maternal progesterone concentration and oxidant/antioxidant balance in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 289-295, 2011.

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

HAUET, T.; YAO, Z.X.; BOSE, H.S.; WALL, C.T.; HAN, Z.; LI, W.; HALES, D.B.; MILLER, W.L.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p.540-554, 2005.

HAYASHI, K.G; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Effect of the Dominant Follicle Aspiration before or after Luteinizing Hormone Surge on the Corpus Luteum Formation in the Cow. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 129-135, 2006.

HAYNA, J.T.; MADILL, S.; ROSER, J.F.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 355-356, 2006.

HERNÁNDEZ, C.J.; DOMINGUEZ, Y.M.; RODRÍGUEZ GARCÍA, J.A.; GUTIÉRREZ C.G. Frecuencia de cuerpos lúteos cavitarios y su relación con la fertilidad en cabras. **Archivos de Zootecnia**, v. 52, p. 389-392, 2003.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, Corpus luteum function and peripheral plasma gonadotrophine concentrations in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 292–298, 1991.

HOYER, P.B.; FITZ, T.A.; NISWENDER, G.D. Hormone- independent activation of adenylate cyclase in large steroidogenic ovine luteal cells does not result in increased progesterone secretion. **Endocrinology**, v. 114, p. 604–608, 1984.

HOYER, P.B.; NISWENDER, G.D. Adenosine 3', 5'- cyclic monophosphate-binding capacity in small and large ovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 119, p. 1822-1829, 1986.

HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species.

Animal Reproduction Science, v. 82-83, p. 461-77, 2004.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corporal lutea and central Luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 34, p. 487–498, 1990.

KENNY, N.; FARIN, C.E.; NISWENDER, G.D. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 191-196, 1989.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M.; SCHAMS, D. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 α . **Journal of Endocrinology**, v.170, p.369-380, 2001.

LACAPERE, J.J.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. **Steroids**, v. 68, p. 569–585, 2003.

LaPORTE, M.E.; WEEMS, Y.S.; ARREGUIN-AREVALO, A.; NETT, T.M.; TSUTAHARA N.; SY, T.; HABERMAN, J.; CHON, M.; RANDER, R.D.; WEEMS, C.W. Effects of LPA2R, LPA3R, or EP4R agonists on luteal or endometrial function in vivo or in vitro and sirtuin or EP1R, EP2R, EP3R or EP4R agonists on endometrial secretion of PGE and PGF2 α *in vitro*. **Theriogenology**, v. 95, p. 8-17, 2017.

LINCOLN, G.A.; SHORT, R.V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 36, 1-52, 1980.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N.L.; MCNATTY, K.P. Populations of granulosa cells in small follicles of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 251–262, 1999.

MANCA, M.E.; MANUNTA, M.L.; SPEZZIGU, A.; TORRES-ROVIRA, L.; GONZALEZ-BULNES, A.; PASCIU, V.; PIU, P.; LEONI, G.G.; SUCCU, S.; CHESNEAU, D.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Melatonin deprivation modifies follicular and corpus luteal growth dynamics in a sheep model. **Reproduction**, v. 147, p. 885-895, 2014.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

MAPLETOFT, R.J.; LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. The ovarian artery as the final

component of the local pathway between a gravid uterine horn and ovary in ewes.

Biology of Reproduction, v. 15, p. 414-421, 1976.

MARTINEZ-ROS, P.; ASTIZ, S.; GARCIA-ROSELLO, E.; RIOS-ABELLAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep.

Animal Reproduction Science, v. 197, p. 317-323, 2018.

McCORKELL, R.B.; WOODBURY, M.R.; ADAMS, G.P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, v. 70, p. 1017–1023, 2008...

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263-304, 1999.

McENERY, M.W.; SNOWMAN, A.M.; TRIFILETTI, R.R.; SNYDER, S.H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier, **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 89, p. 3170–3174, 1992.

McNEILLY, J.R.; BROWN, P.; CRAWFORD, G.; HUHTANIEMI, I.; McNEILLY, A.S. Gonadotrophe ablation in fetal mice leads to a permanent reduction in adult plasma and pituitary LH, **Reproduction Abstract Series**, v. 27, p. 58, 2001.

MILVAE, R.A.; ALILA, H.W.; BUSHMICH, S.L.; HANSEL, W. Bovine corpus luteum function after removal of granulosa cells from the preovulatory follicle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, p. 439-443, 1991.

MOZZAQUATRO, F.D.; VERSTEGEN, J.P.; DOUGLAS, R.H.; TROEDSSON, M.H.; DeLACORTE, F.D.; SILVA, C.A.; RUBIN, M.I. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 56–62, 2010.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1-29, 2000.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone, **Reproduction**, v. 123, p. 333–339, 2002.

O'HARA, L.; SCULLY, S.; MAILLO, V.; KELLY, A.K.; DUFFY, P.; CARTER, F.; FORDE, N.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating and superstimulated

heifers. **Reproduction**, v. 143, p. 673-682, 2012.

OLIVEIRA, J.F.; HENKES, L.E.; ASHLEY, R.L.; PURCELL, S.H.; SMIRNOVA, N.P.; VEERAMACHANENI, D.N.; ANTHONY, R.V.; HANSEN, T.R. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, p.1252-1259, 2008.

O'SHEA, J.D.; CRAN, D.G.; HAY, M.F. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. **Cell and Tissue Research**, v. 210, p. 305–319, 1980.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v. 37, p. 77-85, 1998.

PAPADOPOULOS, V.; BROWN, A.S. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p.103-110, 1995.

PARAMIO, M.T.; IZQUIERDO, D. Current status of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 37–48, 2014.

PARAMIO, M.T.; IZQUIERDO, D. Recent advances *in vitro* embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, p. 152-159, 2016.

PEXTON, J.E.; WEEMS, C.W.; INSKEEP, E.K. Prostaglandin F in uterine venous plasma, ovarian arterial and venous plasma, and in ovarian and luteal tissue of pregnant and nonpregnant ewes. **Journal of Animal Science**, v. 41, p.154–159, 1975.

PINTO, P.; BRAGANÇA, G.M.; BALARO, M.; ARASHIRO, E.; SANTOS, G.B.; SOUZA, G.N.; SOUZA-FABJAN, J.; FONSECA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 266-269, 2018.

RAINERI, C.; SANTOS, F.F.; GAMEIRO, A.H.; Ovinocultura de corte no Brasil: balanço de 2013 e perspectivas para 2014. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 12, p. 12–17, 2014.

RAMIREZ-GODINEZ, J.A.; KIRACOFÉ, G.H.; CARNAHAN, D.L.; SPIRE, M.F.; BEEMAN, K.B.; STEVENSON, J.S.; SCHALLES, J.J. Evidence for ovulation and

fertilization in beef cows with short estrous cycles. **Theriogenology**, v. 17, p. 409–414, 1982.

RAVINDRA, J.P.; RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.; ADAMS, G.P. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p. 501–509, 1994.

RAWLINGS, N.C.; COOK, S.J. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe, **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 289–329, 1993.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 259–270, 2003.

RICKETS, A.P.; FLINT, A.P.F. Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. **Journal of Endocrinology**, v. 86, p. 335–337, 1980.

ROBERTS, R.M.; CHEN, Y.; EZASHI, T.; WALKER, A.M. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. **Seminar in Cell & Developmental Biology**, v.19, p. 170–177, 2008.

RODGERS, R.J.; O'SHEA, J.D.; FINDLAY, J.K. Progesterone production in vitro by small and large ovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 113–124, 1983.

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. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1134–1150, 2002.

SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 444–467, 2011.

SHABANKAREH, H.; HABIBIZAD, J.; TORKI, M. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 362–369, 2009.

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

SHIRASUNA, K.; JIEMTAWEEBOON, S.; RADDATZ, S.; NITTA, A.; SCHUBERTH, H.; BOLLWEIN, H.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Rapid Accumulation of Polymorphonuclear Neutrophils in the Corpus luteum during Prostaglandin F2 α -Induced Luteolysis in the Cow. **PLOS One**, v. 7, e29054, 2012.

SILVIA, W.J.; NISWENDER, G.D. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe: Differences between pregnant and nonpregnant ewes in luteal responsiveness to prostaglandinF2. **Journal of Animal Science**. v. 59, j.746-753, 1984.

20.

SORIANO, G.A.M; de RUEDIGER, F.R., ZUNDT, M.; GOMES, M.A.D.C.N.; de SOUZA, L.F.A.; GIOMETTI, I.C.; de PAULA NOGUEIRA, G.; ZANELLI G.R.; de ALMEIDA REGO, F.C.; CASTILHO, C. Characterization of the LH peak after short and long fixed-time artificial insemination protocols in sheep raised in the tropics. *Anim Sci J*. 2018 Sep;89(9):1245-1252. doi: 10.1111/asj.13051. Epub 2018 Jun
SOUSA, R.T.; GONÇALVES, J.L.; FONTELES, N.L.O.; SANTOS, C.M.; RICCI, G.D.; ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R.; FERNANDES F.E.P.; BOMFIM, M.A.D. Características reprodutivas de ovelhas Morada Nova e Somalis Brasileira. **PubVet**, v.9, p. 495-501, 2015.

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

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, p. 1144–1147, 1996.

STABENFELDT, G.; DROST, M.; FRANTI, C. Peripheral progesterone levels in the ewe during pregnancy and parturition. **Endocrinology**, v. 90, p. 144–149, 1970.

STANGL, M.; KUH HOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v. 52, p. 709–716, 1999.

TAKADA, L.; BICUDO, S.D.; RODRIGUES, C.F.C.; COELHO, L.A.; MENDES, L.C.N.; PERRI, S.H.V. Ovarian response of Suffolk ewes to estrous synchronization using short- term protocol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 314-319, 2012.

TALBOTT, H.; DELANEY, A.; ZHANG, P.; YU, Y.; CUSHMAN, R.A.; CUPP, A.S.; HOU, X.; DAVIS, J.S. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. **Reproduction**, v. 148, p. 21-31, 2014.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, v. 60, p.1-13, 2013.

TEIXEIRA, P.P.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.; MOTHEO, T.F.; SILVA, A.S.; BARROS, F.F.; COUTINHO, L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.; BANDARRA, M.B.; SILVA M.A.; VASCONCELOS, R.O.; RODRIGUES, L.F.; VICENTE, W.R. Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Animal Reproduction Science**. v. 127, p. 169-175, 2011.

TOLENTINO-CASTRO, C.; MIRANDA-JIMÉNEZ, L.; QUERO-CARRILLO A.R.; NAZARIO PESCADOR-SALAS, N. Frequency, morphology, and in vitro progesterone concentration of ewes cavitary corpus luteum. **Agrociencia**, v. 49, p. 267-275, 2015.

THOMPSON, D.L.JR.; GARZA, F.JR.; ST GEORGE, R.L.; RABB, M.H.; BARRY, B.E.; FRENCH, D.D. Relationships among LH, FSH and prolactin secretion, storage and response to secretagogue and hypothalamic GnRH content in ovariectomized pony mares administered testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone, dexamethasone or follicular fluid. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, p. 189-99, 1991.

TRALDI, A.S. Produção in vitro de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.301-306, 2009.

ULLOA-AGUIRRE, A.; ZARIÑÁN, T. The Follicle Stimulating Receptor: Matching Structure and Function. **Molecular Pharmacology**, v. 90, p. 596-608, 2016.

VALASI, I.; THEODOSIADOU, E.; FTHENAKIS, G.C.; PAPANIKOLAOU, T.; DELIGIANNIS, C.; KALOGIANNIS, D.; CHADIO, S.; AMIRIDIS, G.S. Endocrinological profile and follicular development in cyclic ewes subjected to repeated ovum pick-up . **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 180–187, 2013.

VEGETTI, W.; ALAGNA, F. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian

stimulation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, p. 684-94, 2006.

VILARINÕ, M.; RUBIANES, E.; VanLIER, E.; MENCHACA, A. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 91, p. 219–224, 2010.

VILARINÕ, M.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep, **Theriogenology**, v. 79, p. 206–210, 2013.

WAYNE, N.L.; MALPAUX, B.; KARSCH, F.J. How does melatonin code for day length in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period? **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 66–75, 1988.

WEEMS, Y. S., VINCENT, D. L., TANAKA, Y., MILLER-PATRICK, K., NUSSER, K. D., ASHIMINE, D. T., LEDGERWOOD, K., LEE, C. N., WEEMS, C. W. Effect of prostaglandin F2 α (PGF2 α) on sources of progesterone and pregnancy in intact, ovariectomized and hysterectomized 90–100 day pregnant ewes. **Prostaglandins**, v. 43, p. 203-222, 1992.

WEEMS, Y.S.; NETT, T.M.; RISPOLI, L.A.; DAVIS, T.L.; JOHNSON, D.L.; UCHIMA, T. Effects of prostaglandin E and F receptor agonists in vivo on luteal function in ewes. **Prostaglandins Other Lipid Mediate**, v. 92, p. 67-72, 2010.

WEEMS, Y.S.; PANG, J.; RANEY, A.; UCHIMA, T.; LENNON, E.; JOHNSON, D.; NETT, T.M.; RANDEL, R.D.; WEEMS, C.W. Prostaglandin E1 or E2 inhibits an oxytocin-induced premature luteolysis in ewes when oxytocin is given early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 82, p.440-446, 2014.

WIECZOREK, J.; KOSENIUK, J.; CEGLA, M. The repeatable method of laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep: clinical aspects and efficiency of the method. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 21, p. 803–810, 2018.

WILTBANK, M.C.; DISKIN, M.G.; NISWENDER, G.D. Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 65–75, 1991.

WILTBANK, M. C., BELFIORE, C.J.; NISWENDER, G.D. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 97, p. 1–7, 1993.

XIAO, L.; HU, J.; ZHAO, X.; SONG, L.; ZHANG, Y.; DONG, W.; ZHANG, Q.; MA, Y.; LI, F. Expression of melatonin and its related synthase and membrane receptors in the oestrous corpus luteum and corpus luteum verum of sheep.

Reproduction in Domestic Animals, v. 53, p.1142–1148, 2018.

XIAO, L.; SONG, L.; HU, J.; ZHANG, Q.; JIANG, Y.; DUAN, H.; ZHANG, Y.; ZHAO X.; HUA, Y. Dihydrotestosterone synthesis in the sheep corpus luteum and its potential mechanism in luteal regression. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1-12, 2019.

Capítulo 2

Artigo escrito de acordo com as normas da revista "Reproduction in Domestic Animals"

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.html>

Artigo original

Impacto da aspiração folicular associada ou não ao transplante autólogo de células foliculares na formação, desenvolvimento e funcionalidade de corpos lúteos em ovelhas.

Renan Denadai¹, Fernanda Fagali Franchi², Rodrigo Garcia¹, Leticia Cristina Salgado¹, Nuno Emanuel Oliveira Figueiredo Silva¹, Yeda Fumie Watanabe³, Eunice Oba¹, Sony Dimas Bicudo¹.

1 Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Botucatu/SP.

2 Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Botucatu/SP.

3 Vitrogen – Biotecnologia em Reprodução animal, Cravinhos/SP.

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a formação de corpos lúteos (CL) decorrentes da aspiração folicular guiado por laparoscopia (LOPU) na espécie ovina, e o efeito do transplante autólogo de células foliculares sobre as características morfológicas e funcionais dos CLs. As ovelhas tiveram o estro sincronizado pela utilização de dispositivo intravaginal impregnado de acetato de medroxiprogesterona (60 mg) por 14 dias, associado a 400 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo. Em momento ovulatório, 48 horas após administração do eCG realizou-se a LOPU dos folículos ovarianos (Grupo LOPU – LG, n= 6), ou LOPU associada com transplante autólogo de células foliculares

(Grupo reposição – RG, n=7), em 5 animais a ovulação ocorreu de maneira espontânea (Grupo controle – CG). Imediatamente antes da LOPU foi realizada avaliação ultrassonográfica ovariana das ovelhas, e esta foi repetida diariamente, e coleta de sangue para quantificação de progesterona (P4) plasmática a cada 48 horas, se iniciando 24 horas após a LOPU, até o momento de constatação de uma nova ovulação. Observamos a formação de CLs em todas as ovelhas submetidos à LOPU, sendo que naquelas do LG e RG formaram-se mais estruturas que nas ovelhas do CG. A área luteínica individual (LAI) dos CLs foi menor no LG, já a área luteínica total (LAT) foi semelhante entre o LG e RG, sendo ambas maiores do que a do CG, no entanto a concentração plasmática de P4 não diferiu entre os grupos. Portanto, na espécie ovina, a ablação de folículos em momento pré ovulatório por aspiração resulta na formação de CLs funcionais, e o transplante autólogo das células obtidas do aspirado aumenta a área luteínica, sendo que a LOPU associada ou não a reposição das células leva à formação de um número de CLs superior ao de uma ovulação.

Palavras Chave: LOPU, Desenvolvimento luteal, Laparoscopia, Ultrassonografia, Progesterona, Ovinos.

1 Introdução

O corpo lúteo (CL) é uma glândula ovariana transitória responsável pela produção de progesterona (P4), cuja concentração plasmática na ovelha atinge o pico entre quatro e seis ng/mL durante o ciclo estral (Bartlewski et al., 1999; Contreras-Solis et al., 2008). O desenvolvimento do CL ocorre após o processo de crescimento, maturação, ruptura do folículo ovariano e liberação do oócito (Niswender et al., 2000). Contudo é possível induzir a formação do CL por

aspiração do folículo dominante em equinos (Hinrichs et al. 1991, Bracher et al.; 1993; Bogh et al., 2000; Hayna et al., 2006; Mozzaquatro et al., 2010). Porém, sua luteinização é menos frequente se o procedimento for realizado durante a fase luteínica (Bogh et al., 2000) ou durante o período de transição (Alvarenga et al., 1999).

Existe uma correlação positiva entre o tamanho do folículo aspirado e a área do CL formado, e consequentemente a produção de P4 (Hinrichs et al., 1991; Bogh et al., 2000; Hayna et al., 2006). CLs oriundos da aspiração folicular em vacas são menores do que os formados após uma ovulação espontânea (O'Hara, 2012). A ocorrência do pico de LH endógeno é fundamental para a formação do CL decorrente de aspiração folicular (Hayashi et al., 2006).

Em bovinos a remoção das células da granulosa determina a formação de um CL com menor capacidade esteroidogênica, porém quando as células são repostas a produção de P4 fica próxima do normal (Milvae et al., 1991). Hipotetizamos que a LOPU em momento pré-ovulatório leva a formação de CL em ovelhas e que o transplante autólogo de células foliculares leva interfere positivamente no desenvolvimento e capacidade esteroidogênica destes CL. Assim o objetivo deste estudo foi investigar o desenvolvimento morfológico e a funcionalidade de CLs formados em decorrência da LOPU, com ou sem reposição de células do aspirado em ovelhas.

2 Materiais e métodos

2.1 Condições experimentais e dos animais

Todas as metodologias utilizadas no experimento estavam em consonância com os princípios éticos na experimentação animal e certificadas pela “Comissão de Ética no Uso Animal” (CEUA) da FMVZ-Unesp-Botucatu,

protocolo 0030/2017. O estudo foi conduzido no final do verão e início do outono, 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, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade do Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no município de Botucatu-SP (FMVZ – UNESP – Botucatu), situados à latitude de 22°53'09" sul e longitude de 48°26'42" oeste, com altitude de 804 metros.

Foram utilizadas 18 ovelhas cíclicas das raças Bergamácia e Lacaune, com idade entre três e cinco anos, e escore de condição corporal entre 2,5 e 4 (Escala de 1 a 5). As ovelhas foram mantidas em pastagens de capim Aruana (*Panicum maximum*), suplementadas com 300 g de concentrado/dia, sal mineral e água *ad libitum*. Os animais experimentais foram randomicamente divididos em três grupos experimentais, Grupo LOPU (LG, n=7), Grupo Reposição (RG, n=8) e Grupo Controle (CG n=5). A ciclicidade ovariana foi confirmada antes do tratamento hormonal por exame ultrassonográfico dos ovários em intervalo de 24 horas durante sete dias, verificando o desenvolvimento folicular e a presença do CL, sendo constatado que todos os animais apresentavam-se em atividade reprodutiva.

As ovelhas dos três grupos receberam dispositivo intravaginal impregnado com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (PROGESPON®- Zoetis Brasil) que foi mantido por 14 dias sendo então removidos e administrado concomitantemente 400 UI de gonadotrofinas coriônica equina (eCG) (NOVORMON® Zoetis Brasil) por via intramuscular. Para certificar-se da inexistência de CLs funcionais, no quarto dia após inserção do dispositivo intravaginal foi administrada 140 µg de cloprostenol (Ciosin®- Agner União

Brasil). Nas ovelhas dos LG e RG, 48 horas após a remoção dos dispositivos vaginais foi realizada LOPU de todos os folículos ovarianos visíveis, sendo feita a reposição de células da granulosa autóloga naquelas do RG. Foi permitido às ovelhas do CG, a ocorrência de ovulações espontâneas sem que fosse realizada a laparoscopia.

Nos três grupos de ovelhas, as avaliações ultrassonográficas dos ovários se iniciaram 48 horas após a remoção dos dispositivos vaginais e se repetiram a cada 24 horas, até que fosse constatada nova ovulação. Nas ovelhas que foram submetidas à LOPU, a ultrassonografia se deu imediatamente antes do procedimento. Para a determinação da concentração de progesterona, coletaram-se amostras de plasma sanguíneo a partir do primeiro dia após a LOPU ou ovulação, repetindo a coleta a cada 48h até o 15º dia.

A partir do momento onde não foi mais visibilizada a presença do CL ao exame ultrassonográfico, foi realizada a detecção de sinais de estro diariamente, utilizando carneiros cirurgicamente preparados. Determinou-se o fim do ciclo estral no momento onde não houve mais aceitação de monta pela fêmea, e ausência do folículo grande à ultrassonografia, sugerindo a ocorrência da ovulação.

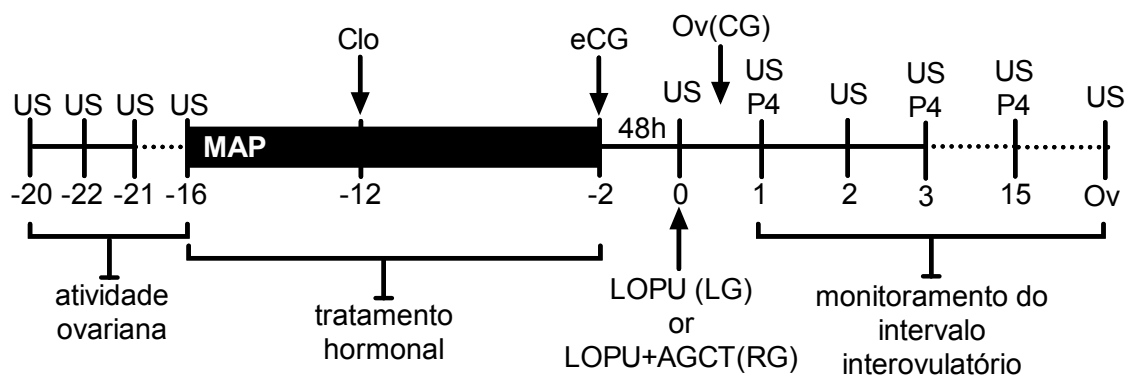


FIGURA 1 – Delineamento experimental, determinação da ciclicidade ovariana, tratamento hormonal, monitoramento ovariano durante o intervalo interovulatório. Grupo LOPU (LG, n=7), Grupo Reposição (RG, n=8) e Grupo Controle (CG, n=5). US = exame ultrassonográfico; MAP = acetato de medroxiprogesterona; Clo = cloprostenol; eCG = gonadotrofina coriônica equina; LOPU = aspiração folicular guiada por laparoscopia; AGCT= transplante autólogo de células da granulosa; P4 = dosagem de progesterona; Ov=Ovulação; h = horas; ↓ aplicação ou ocorrência.

2.2 Laparoscopia para realização das LOPUs

Previamente à laparoscopia, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas, Imediatamente antes do procedimento foi administrado 30.000 UI/kg de penicilina benzatina, sendo a seguir realizada anestesia geral de curta duração com associação de cetamina (5,0 mg/kg) e diazepam (0,5 mg/kg), além da anestesia peridural na região lombo sacra, com 4mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor e bloqueio anestésico no local de introdução dos trocateres, com lidocaína 2% com vaso constritor.

Após contenção das ovelhas em maca apropriada, inseriu-se os três trocateres nas regiões: Paramediana retroumbilical esquerda, para inserção da ótica e Mediana retroumbilical; Paramediana retroumbilical direita para inserção das pinças de manipulação e do sistema de aspiração.

Foi empregado o “*Sistema Prático de Aspiração para Ovinos®*” (WTA - Tecnologia Aplicada - Brasil), acoplado em tubo de ensaio plástico de 50 mL contendo solução tampão fosfato-salino (PBS) e 0,5% de heparina aquecida a 37°C. A pressão de vácuo gerada pela Bomba de Vácuo Digital BV 003d® (WTA

- Tecnologia Aplicada - Brasil), foi mantida constante com valores próximos a 50 mmHg.

2.3 Reposição de células da granulosa

Nas ovelhas do grupo RG, imediatamente após a LOPU, o meio contendo o aspirado foi levado a estereomicroscópio (Olympus SZ51®), para que fossem identificados e removidos COCs sendo a seguir transferido para tubos plástico cônicos de 1,5 mL que após centrifugação a 50 x *g* por 5 minutos teve o sobrenadante removido, restando apenas o pellet, que foi ressuspendido à 37°C em 0,1 mL de meio TCM-199 tamponado com Hepes, e acrescido de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina. O fluido resultante foi envasado em pipeta de Robertson (Minitube®) e por via laparoscópica, depositado no interior da cavidade remanescente do maior folículo aspirado.

2.4 Avaliação ultrassonográfica dos ovários

Para a realização dos exames ultrassonográficos, procedeu-se a remoção das fezes da ampola retal a que foi preenchida por solução aquosa de carboximetilcelulose, e com o transdutor linear prostático de frequência 7,5 MHz (Modelo UST-660-7,5) para o equipamento Aloka® Prosound 2 VET, ambos os ovários de cada animal foram avaliados. Os folículos ovarianos foram avaliados quanto o seu diâmetro médio (DMF- média das mensurações longitudinal e transversal) e classificados em pequenos (< 2,5 mm); médios (2,5 a 4,5 mm) e grandes (>4,5 mm).

Foram realizadas as seguintes mensurações dos CLs detectados: Diâmetro (DMCL, cm), que se deu pela média dos dois maiores diâmetros mensurados; área total da estrutura (TA, cm²) e; quando presentes área da cavidade (CA, cm²) luteal. Nos CLs obtidos em ovelhas do RG foi anotada

também a área de uma estrutura hiperecólica em relação ao estroma ovariano (HCE, cm²). A área lútea individual dos CLs (LAI, cm²) foi obtida através da somatória da TA e HCE subtraindo a CA (LAI = TA + BA - CA). A área lútea total por animal (LAT, cm²) foi obtida pela soma das LAIs de todos os CLs detectados em ambos ovários.

2.5 Dosagem de P4 plasmática

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular em tubos Vacutainers® (Becton Dickinson para o Brasil) contendo anticoagulante (Ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA) e mantidas sob refrigeração até realização de centrifugação a 1.200 x g, durante 10 minutos para obtenção do plasma, que foi aliquoteado em tubos plásticos individuais, identificados e mantidos a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

As dosagens plasmáticas de progesterona (ng/mL) foram realizadas por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando kits comerciais (Beckman Coulter/IM1188) de elevada especificidade para progesterona, sendo o Iodo¹²⁵ o elemento radioativo traçador. Os procedimentos para a realização das dosagens seguiu as especificações do fabricante. A contagem de radioatividade foi realizada em contador gama automatizado (Perkin Elmer/WIZARD 1470 Automatic Gamma Counter).

As análises foram realizadas em ensaio único, sendo o limite de detecção de 0,02 ng/mL, e os coeficientes de variação intraensaio foi de 1,6%.

2.6 Forma de análise de resultados

Os dados foram compilados em tabelas como média ± desvio padrão (DP) e em figuras como média. Foram realizadas comparações levando-se em conta o tempo e os grupos, por meio de ANOVA fatoriais para medidas

repetidas (tempo) e não repetidas (grupo). Quando detectados efeitos significativos de tempo e/ou grupo, foram aplicados *post hoc* de Bonferroni para a identificação de diferenças globais entre grupos ou tempos. A partir da determinação da fase estática de desenvolvimento do CLs, foi realizada a média do DM, LAI e LAT das estruturas encontradas neste intervalo. O nível de significância adotado no presente estudo foi de $p < 0,05$. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos no software Statistical Package for Social Sciences 17 (SPSS, IBM, EUA).

3 - Resultados

3.1 População folicular e número de corpos lúteos formados

Após 48 horas da remoção do dispositivo vaginal, o DMF e o número dos folículos grandes ($> 4,5$ mm) foram semelhantes nos três grupos (Tabela1). No exame subsequente realizado 24 horas após a primeira avaliação, não foi detectada a presença de folículos grandes nos ovários das ovelhas de nenhum dos três grupos.

O número de CLs no período de avaliações nos animais dos Grupos LG e RG foi maior do que o observado no Grupo CG, o número médio de folículos grandes nos ovários 48 horas após remoção do dispositivo intravaginal de P4 foi igual ao de CLs formados nos grupos LG e RG, no grupo CG o número médio de CLs foi menor que o de folículos grandes (Tabela 1).

TABELA 1 – Média±DP dos parâmetros reprodutivos avaliados durante o período entre a aspiração folicular ou ovulação e a ocorrência de nova ovulação em ovelhas dos grupos experimentais.

Parâmetros Reprodutivos	Grupo LOPU (Média±DP)	Grupo Reposição (Média±DP)	Grupo Controle (Média±DP)
Diâmetro dos folículos grandes* _(mm)	6,3±0,6	5,9±1,0	5,9±0,8
Nº de Folículos Grandes * _(nº)	1,7±0,8	1,9±0,7	1,6±0,5 ^A
Nº de corpos lúteos _(nº)	1,7±0,5 ^a	1,4±0,5 ^a	1,0±0 ^{Bb}
Cavidade _(mm²)	7,7±5,8 ^a	5,8±4,1 ^a	1,2±0,7 ^b
Duração da cavidade _(dias)	8,6±4,7 ^a	12,4±3,8 ^a	5,5±2,3 ^b
Duração corpo lúteo _(dias)	14,4±1,8	15,8±1,8	14,2±1,4
Intervalo Interolulatório _(dias)	17,7±1,2	18,2±1,0	16,5±1,6

^{AB}Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e ^{a, b} diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças nos valores (P<0,05).

*Folículos presentes no ovário 48 horas após remoção do dispositivo intravaginal.

3.2 Cavidade dos Corpos Lúteos e Estrutura Hiperecótica

Foi observada a presença de uma cavidade circular com conteúdo anecóico em alguns CLs durante a avaliação ultrassonográfica. Essa estrutura se apresentou de maneira diferente entre os grupos em relação a sua área e frequência durante o período de observações. No CG a área da cavidade e a média do número de dias que estava presente foram menores em relação aos grupos LG e RG (Tabela 1).



FIGURA 2 – A: Sonograma de corpo lúteo solido de animal do Grupo Controle, se apresentando como área circunscrita hipercóico em relação ao estroma ovariano. B: Sonograma de corpo lúteo, em animal do Grupo LOPU, com grande cavidade preenchida por conteúdo anecóico, e apresentando na periferia área com características ultrassonográficas de luteinização. C: Sonograma de corpo lúteo do Grupo Reposição com seta indicando a presença de botão hiperecótico projetado na cavidade lútea.

Em todos os animais do Grupo RG observou-se a formação da HCE, localizada na porção interna da cavidade luteínica próxima a margem em um dos polos da área lútea (Figura 2 - C). Essa estrutura estava presente nos CLs correspondentes aos folículos onde foi realizada a reposição das células da granulosa. A média das áreas HCE foi $1,4 \pm 0,5 \text{ mm}^2$, sendo que esta persistiu por $4,8 \pm 3,6$ dias em média e sua última visibilização foi no dia $8 \pm 3,5$ de observação. Por apresentar aspecto ultrassonográfico semelhante ao do CL, a área dessa estrutura foi somada a área lútea de seu CL.

3.3 Desenvolvimento dos Corpos Lúteos

A fim de caracterizar o desenvolvimento luteal avaliou-se o DMCL, LAI, LAT e concentração plasmática de P4, para os três grupos estudados, verificou-se diferença dos padrões no decorrer do tempo, comuns em todas as variáveis. Estas quatro variáveis apresentaram claramente um padrão onde é detectado uma fase de incremento, seguida por uma fase estática e por fim uma fase de regressão (Figura 3).

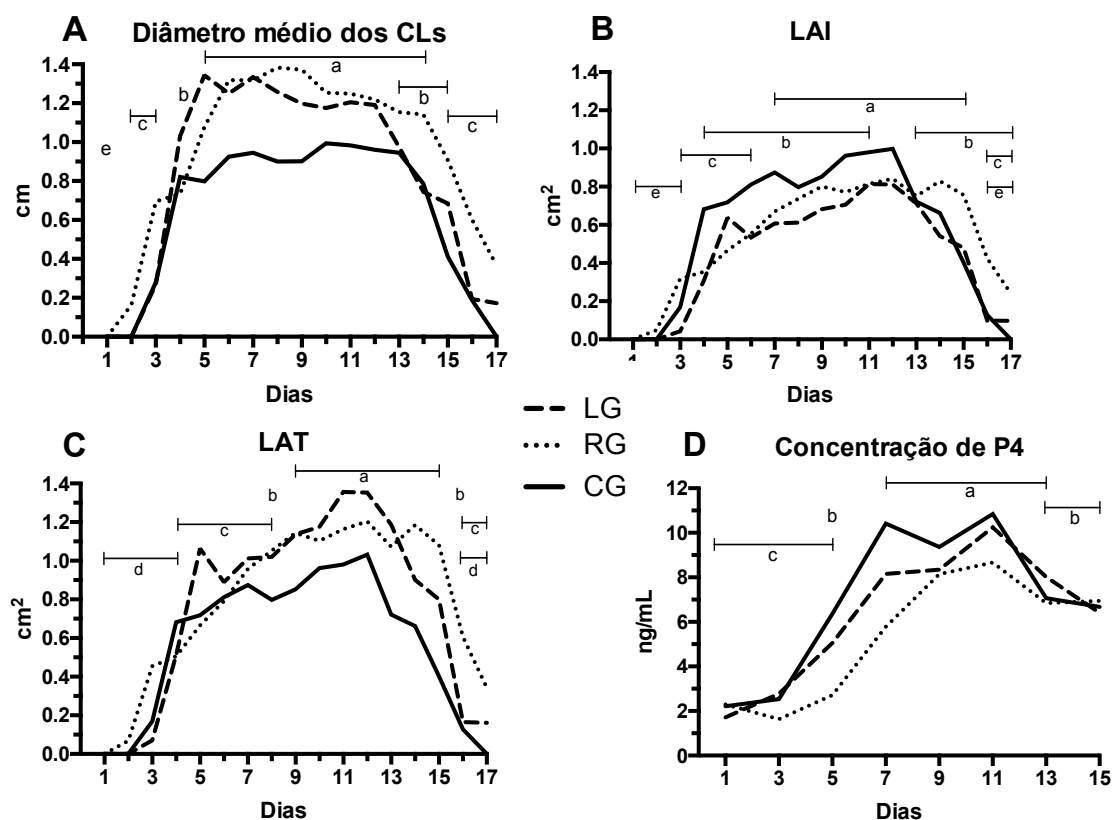


FIGURA 3 – Desenvolvimento lúteo a ultrassonografia e dosagem de progesterona plasmáticas em ovelhas do Grupo LOPU (LG), Grupo Reposição (RG) e Grupo Controle (CG), durante o intervalo interovulatório. A - Média do diâmetro dos corpos lúteos (DM) durante os dias do período de observações. B - Média da área individual dos corpos lúteos (LAI) durante os dias o intervalo interovulatório. C - Média da área lútea total (LAT) durante os dias do período de observações. D - Média das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante o período de observações. LG: Grupo LOPU (linha tracejada), RG: Grupo Reposição (linha pontilhada), CG: Grupo Controle (linha contínua), CL: Corpo Lúteo. Diferentes letras minúsculas indicam diferença nos valores entre os dias ($P < 0,05$).

Esta constatação possibilitou que fosse realizada a avaliação específica da fase estática, comparando-se os grupos em relação às médias desta fase (Figura 4). O DMCL diferiu entre os grupos LG, RG e CG ($P < 0,05$) (Figura 4 - A). Na fase estática, a LAI foi semelhante entre os grupos RG e o CG e menor no LG ($P < 0,05$) (Figura 4 - B).

A LAT média durante a fase estática do grupo CG foi menor do que no LG e RG ($p < 0,05$), sendo que não houve diferença entre estes grupos (Figura 4 - D). A média da concentração plasmática de P4 durante a fase estática foi semelhante entre os grupos três grupos (Figura 4 - E).

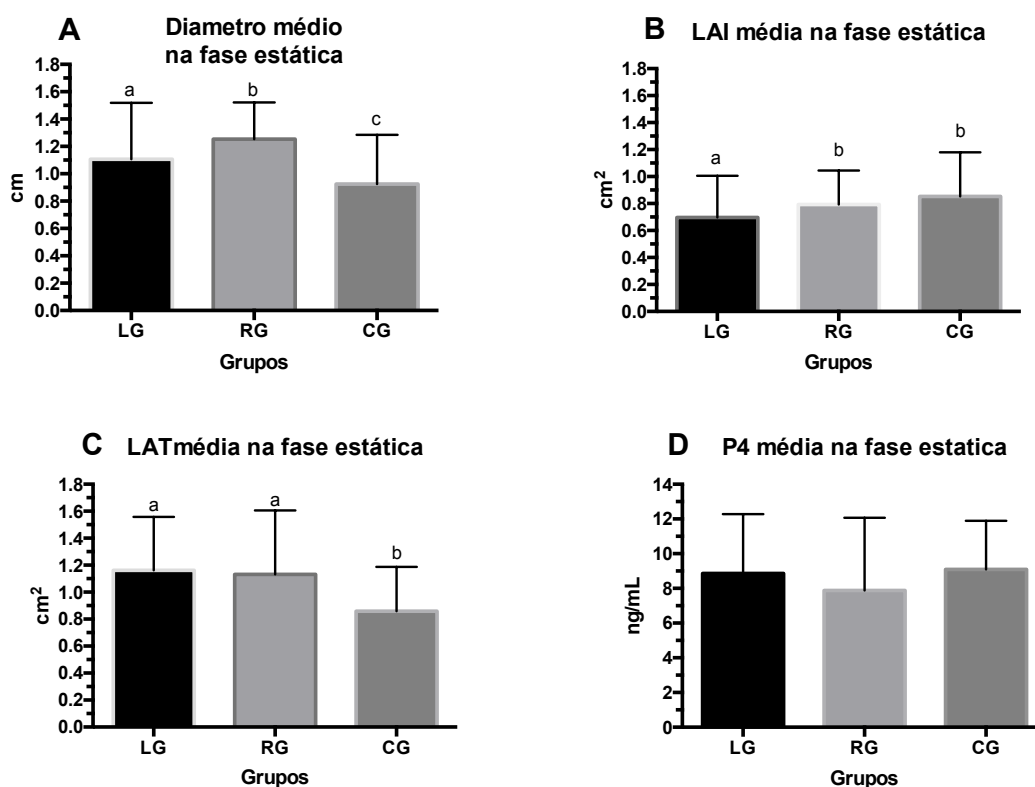


FIGURA 4 – A – Média $\pm$ DP do diâmetro dos corpos lúteos (DM) em ovelhas durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. B - Média da área individual dos corpos lúteos (LAI) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. C - Média da área lútea total (LTA) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. D - Média das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante fase estática do desenvolvimento do corpo lúteo. LG: Grupo LOPU, RG: Grupo Reposição, CG: Grupo Controle, LG>: Maior corpo lúteo do Grupo LOPU, LG<: Menor corpo lúteo do Grupo LOPU, RG: Maior corpo lúteo do Grupo Reposição, RG: Menor corpo lúteo do Grupo Reposição, CG: Grupo Controle, CL: Corpo Lúteo. Diferentes letras minúsculas indicam diferença nos valores entre os grupos ($P < 0,05$).

O intervalo de duração do CL, determinado pelo ultimo dia de CL ao exame ultrassonográfico não variou entre os grupos. O intervalo Interlutatório que ficou caracterizada pelo fim das manifestações de estro ocorrência de nova ovulação, não diferiu entre os grupos (Tabela 1).

4 - Discussão

A constatação da ausência de folículos grandes nos ovários das ovelhas de todos os grupos, no exame subsequente realizado 24 horas após a primeira avaliação é indicativo da efetividade da LOPU no Grupo LOPU (LG) e Grupo Reposição (RG) ou da ocorrência de ovulações espontâneas Grupo Controle (CG). A ovelha apresenta um ciclo estral variando entre 16 e 17 dias de duração (Ginther, Kot e Wiltbank, 1995; Bartlewski et al., 1999). A média de dias de para

ocorrência de nova ovulação não diferiu entre os grupos, demonstrando que os procedimentos não interferiram no desenvolvimento de um ciclo estral normal. O discreto aumento numérico de dias em relação a literatura pode ter ocorrido por ter sido considerado como dia 0 o momento da LOPU e não o final do estro.

Nosso estudo demonstrou a efetividade da aspiração folicular em momento pré-ovulatório na formação de CLs funcionais na espécie ovina, semelhante ao descrito nas espécies equina (Bogh et al., 2000; Hayna et al., 2006; Mozzaquatro et al., 2010) e bovina (Milvae et al., 1991; Hayashi et al., 2006; O'Hara et al.; 2012), onde o CL formado tem capacidade de produção de P4 o que caracteriza sua funcionalidade.

No conjunto os grupos apresentaram intervalo de duração do CI ao longo do tempo semelhante ao descrito previamente (Baby e Bartlewski, 2010; Seekallu et al, 2010; Gallienne et al; 2012). Ao se levar em conta a área lútea, o padrão de desenvolvimento individual dos CLs apresentaram claramente uma fase de crescimento, uma fase estática e uma fase de regressão. Perfil semelhante foi observado nas concentrações plasmática de P4 ao longo das observações, demonstrando uma fase de incremento, uma fase de platô e uma fase de decenso.

A regressão do CL se divide em duas fases, uma inicial, a luteólise funcional, que ocorre entre o 12º e 14º dias do ciclo estral, diminuindo a produção de P4, e outra tardia, a luteólise morfológica, que ocorre 15 dias após a ovulação, com regressão estrutural do CL (NISWENDER et al, 2007). Em todos os grupos experimentais esse evento ficou caracterizado, sendo que a redução

na P4 plasmática se deu no intervalo entre 11º e 13º dia, já a redução das LAI e LAT, a partir do 15º dia de existência do CL.

A realização da LOPU 48 horas após a remoção do dispositivo vaginal contribuiu significativamente para adequada formação dos corpos lúteos e produção de P4, sendo que pico pré-ovulatório de LH é fundamental para que ocorra a ovulação e desenvolvimento lúteo adequado (Goodman e Inskeep, 2006), em bovinos quando a aspiração é realizada antes do pico de LH não ocorre o desenvolvimento luteal (Hayashi et al., 2006). Apesar de não caracterizado o pico de LH em nosso experimento, por hipótese acreditamos que a aspiração se deu posterior a este, sendo que na ovelha o pico endógeno de LH ocorre entre 24 e 36 horas após o início das manifestações de estro (Souza et al., 1995), e em ovelhas com o estro sincronizado utilizando dispositivo intravaginal de P4 associado ao eCG o pico endógeno de LH ocorre em média 30 e 44 horas após a remoção da P4 (Martinez-Ros et al., 2018, Soriano et al., 2018), ou seja, antes das 48 horas.

O diâmetro do folículo aspirado interfere na formação de CLs após a aspiração folicular, sendo que este apresenta uma correlação positiva com o tamanho e produção de P4 (Hinrichs et al., 1991; Bogh et al., 2000; Hayna et al., 2006). Embora o número e o diâmetro dos folículos grandes (>4,5 mm) presentes no ovário no momento anterior da LOPU ou ovulação tenham sido semelhantes entre os grupos, a LAI média foi menor nos grupos submetidos a aspiração. Acreditamos que a remoção de células da granulosa durante o processo de aspiração tenha sido o principal fator que influenciou nesta menor LAI encontrada no LG, reforçam a ideia descrita O'Hara et al. (2012) em bovinos,

onde a aspiração folicular resultou na formação de CLs menores do que aqueles decorrentes de ovulação natural.

Outro fato por nos observado que reforça a importância da remoção das células da granulosa durante aspiração folicular no desenvolvimento luteal, foi o incremento na LAI observada no grupo RG em comparação com o LG, semelhante ao descrito em bovinos, onde na ocorrência da reposição destas células após a aspiração folicular para indução na formação do CL, os animais apresentam produção de P4 próxima a que ocorre em uma estrutura formada a partir de ovulação natural normal (Milvae et al., 1991), outro estudo demonstra que em ratos as Células da Granulosa quando transplantadas para o interior da capsula renal levam ao desenvolvimento de tecido luteínico, demonstrando a capacidade de luteinização deste tipo celular independente do local do transplante (Farookhi et al., 1982).

No presente estudo, os grupos LG e RG apresentaram média do número de CLs maior do que no CG, levando a uma maior LAT média na fase estática nestes grupos, entretanto, este incremento de área lútea não contribuiu para um incremento nas concentrações de P4 em relação ao CG, porém é descrito que em ovelhas com dupla ovulação, a onde os CLs formados possuem área individual menor, porém, quando somadas as LAIs, demonstram uma LAT maior do que a observada em animais com ovulação única, com concentração plasmática de P4 maior nos animais de dupla ovulação (Shabankareh et al., 2009).

Nos grupos LG e RG o número de folículos grandes não foi diferente da média de CLs formados, já no grupo CG o número de CLs foi menor que no de

folículos, demonstrando a luteinização de folículos não chegariam a ovular. A ausência do oócito no cultivo *in vitro* de células da granulosa (Eppig et al., 1997, 1998, Diaz et al., 2007), bem como a desestruturação da lamina basal durante a ovulação (Smith et al., 1994) são descritos como fatores importantes para a ocorrência de luteinização, porém o pico de LH aparentemente é fator preponderante para a adequada formação do CL, pois em ovelhas quando ruptura do folículo e expulsão oócito são inibidas farmacologicamente, ocorre à formação de um CL funcional com fase luteínica normal (Murdoch e Dunn, 1984).

Acreditamos que um conjunto de fatores contribui para a formação dos CLs adicionais nos grupos LG e RG, sejam os fatores mecânicos promovidos pela LOPU resultando na como e remoção do oócito e a desestabilização da membrana basal, associado ao momento escolhido para a realização da LOPU. Uma diferença de estágio de desenvolvimento do entre o maior folículo e o segundo maior folículo pode ter contribuído para que no grupo CG não ocorresse formação do CL adicional, possivelmente por uma menor expressão de receptores para LH (LHR) pelas células da granulosa destes folículos, se assemelhando ao descrito em bovinos, onde a expressão de receptores de LH pela célula da granulosa, que é fundamental para ocorrência da ovulação, se eleva de acordo com o crescimento do diâmetro folicular (Xu et al., 1995; Beg et al. 2001), sendo assim por hipótese a formação do CL adicional pode ter ocorrido por uma quantidade suficiente de LHR no segundo maior folículo para ocorrência de luteinização porém insuficientes para desencadear o processo de ovulação.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a LOPU dos folículos ovarianos de ovelhas em momento próximo a ovulação resulta em formação de

CLs funcionais, porém com área lútea individual menor que daqueles formados a partir de ovulação espontânea. A aspiração concomitante de todos os folículos visíveis em ambos os ovários, induzir à formação de CLs acessórios, resultando em área lútea total superior, porém com produção de P4 similar CL àquele formado a partir de ovulação espontânea. A reposição de células autólogas presentes no fluido obtido pela LOPU, leva a formação de uma HCE ao ultrassom, com ecotextura e ecogenicidade similares a do CL, sugerindo uma possível luteinização. Mais estudos se fazem necessários para avaliação do CL oriundo de LOPU, visando avaliar aspectos de morfofuncionalidade como arcabouço citohistológico, vascularização da estrutura e verificação da efetividade desses CLs em contribuir com uma fertilidade aceitável por permitir o desenvolvimento e manutenção de gestação.

5- Referências

- Alvarenga, M. A., Mccue, P. M. & Franz, L. C. (1999). Effect of follicular aspiration on ovarian function in transitional mares. *Theriogenology*, 51, 431. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)91990-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)91990-8)
- Baby, T. E. & Bartlewski, P. M. (2011). Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. *Reproductive Biology*, 11, 19-36. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60061-8](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60061-8)
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A. & Rawlings, N. C. (1999). 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*, 115, 111-124. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150111>
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C. W. & Ginther, O. J. (2001). Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*; 64, 432–441. doi: 10.1095/biolreprod64.2.432
- Bogh, I. B., Hoier, R., Synnestvedt, B. & Greve, T. (2000). Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology*, 54, 877–888. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00398-8)
- Bracher, V., Parlevliet, J., Fazeli, A. R., Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Dieleman, S. J., Taverne, M. A. M. & Colenbrander, B. (1993). Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 15, 75–78. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04832.x>
- Contreras-Solis, I., Diaz, T., Lopez, G., Caigua, A., Lopez-Sebastian, A. & Gonzalez-Bulnes A. (2008). Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Animal Reproduction Science*, 104, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.021>
- Diaz, F.J., Wigglesworth, K. & Eppig, J.J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*. 120, 1330-1340. doi: 10.1242/jcs.000968

- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F. L. & Hirao, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 56, doi:976-984. 10.1095/biolreprod56.4.976
- Eppig, J. J., Pendola, F. L. & Wigglesworth, K. (1998). Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor messenger RNA by granulosa cells in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 49, 327-332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199803\)49:3<327::AID-MRD13>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199803)49:3<327::AID-MRD13>3.0.CO;2-T)
- Farookhi, R., Keyes, P.L. & Kahn, L. E. (1982). A Method for Transplantation of Luteinizing Granulosa Cells: Evidence for Progesterone Secretion. *Biology of Reproduction*, 27,1261–1266. Doi; 10.1095/biolreprod32.4.935
- Gallienne, J., Gregg, C., LeBlanc, E., Yaakob, N., Wu, D., Davies, K., Rawlings, N., Pierson, R., Deardon, R. & Bartlewski, P. (2012). Correlations between ultrasonographic characteristics of corpora lutea and systemic concentrations of progesterone during the discrete stages of corpora lutea lifespan and secretory activity in cyclic ewes. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 509-514. doi: 10.1258/ebm.2011.011179..
- Ginther, O. J., Kot, K. & Wiltbank, M. C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43, 689-703. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00074-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00074-5)
- Goodman, R. L & Inskeep, E. K. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. Neill JD, ed. Knobil and Neill's physiology of reproduction (3rd

ed.). Elsevier, Amsterdam: Elsevier, 2389–2447.

- Hayashi, K. G., Matsui, M., Acosta, T. J., Kida, K. & Miyamoto, A. (2006) Effect of the Dominant Follicle Aspiration before or after Luteinizing Hormone Surge on the Corpus Luteum Formation in the Cow. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 129-135. <https://doi.org/10.1262/jrd.17049>
- Hayna, J. T., Madill, S., Roser, J. F. & Troedsson, M. H. T. (2006) The effect of transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*, 94, 355-356. Doi: [10.1016/j.anireprosci.2006.03.070](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.070)
- Hinrichs, K., Rand, W. M. & Palmer, E. (1991) Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, Corpus luteum function and peripheral plasma gonadotrophine concentrations in the mare. *Biology of Reproduction*, 44, 292–298. Doi: [10.1111/j.2042-3306.1997.tb05095.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05095.x)
- Martinez-Ros, P., Astiz, S., Garcia-Rosello, E., Rios-Abellan, A. & Gonzalez-Bulnes, A. (2018) Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Animal Reproduction Science*, 197, 317-323. doi: [10.1016/j.anireprosci.2018.08.046](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.046)
- Milvae, R. A., Alila, H. W., Bushmich, S. L. & Hansel, W. (1991) Bovine corpus luteum function after removal of granulosa cells from the preovulatory follicle. *Domestic Animal Endocrinology*, 8, 439-443. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(91\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0739-7240(91)90012-9)
- Mozzaquatro, F. D., Verstegen, J. P., Douglas, R. H., Troedsson, M. H., DeLaCorte, F. D., Silva, C. A. & Rubin, M. I. (2010). Luteal function induced

- by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. *Animal Reproduction Science*, 119, 56–62. Doi: [10.1016/j.anireprosci.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.012)
- Murdoch, W. J. & Dunn, T. G. (1983). Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69, 671-675. doi: 10.1530/jrf.0.0690671
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K. & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80, 1-29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>
- Niswender, G. D., Davis, T. L., Griffith, R. J., Bogan, R. L., Monser, K., Bott, R. C., Bruemmer, J. E. & Nett, T.M. (2007). Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 191-206. Doi: 10.5661/RDR-VI-191
- O'Hara, L., Scully, S., Maillo, V., Kelly, A. K., Duffy, P., Carter, F., Forde, N., Rizos, D. & Lonergan, P. (2012). Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating and superstimulated heifers. *Reproduction*, 143, 673-682. doi: 10.1530/REP-11-0505.
- Seekallu, S. V., Toosi, B. M., Duggavathi, R., Barrett, D. M., Davies, K. L., Waldner, C. & Rawlings, N. C. (2010). Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology*, 73, 670-80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.007.
- Shabankareh, H., Habibizad, J. & Torki, M. (2009) Corpus luteum function

following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. *Animal Reproduction Science*, 114, 362–369. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.10.011.

Smith, M. F., McIntush, E. W. & Smith, G. W. (1994) Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, 72, 1857-1872. <https://doi.org/10.2527/1994.7271857x>

Soriano, G. A. M., de Ruediger, F. R., Zundt, M., Gomes, M. A. D. C. N., de Souza, L. F. A., Giometti, I. C., de Paula Nogueira, G., Zanelli, G. R., de Almeida Rego, F. C. & Castilho, C. (2018). Characterization of the LH peak after short and long fixed-time artificial insemination protocols in sheep raised in the tropics. *Animal Science Journal*, 89, 1245-1252. doi: 10.1111/asj.13051.

Souza, C. J. H., Chagas, L. M., Moura, A. & Moraes, J. C. F. (1994). Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. *Ciência Rural*, 25, 277-281. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781995000200018>

Valasi, I., Theodosiadou, E., Fthenakis, G. C., Papanikolaou, T., Deligiannis, C., Kalogiannis, D., Chadio, S. & Amiridis, G.S . (2013). Endocrinological profile and follicular development in cyclic ewes subjected to repeated ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 138, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.026>

Vilariñoa, M., Rubianes E., van Lier, E. & Menchaca A. (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small*

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.02.014>

Xu, Z. Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A. & Youngquist, R. S. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, 53, 951–957. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.4.951>

Artigo escrito de acordo com as normas da revista "Small Ruminant Research"

<https://www.elsevier.com/journals/small-ruminant-research/09214488/guide-for-authors>

(Technical note)

Follicular aspiration just before ovulation induces the formation of functional corpus luteum with ability to maintain pregnancies obtained by oocytes intrafallopian transfer and artificial insemination in sheep.

Renan Denadai¹, Luiz Fernando Salgado Scagion¹, Tatiana Lih Ikeda¹, Paula Barreto da Rocha¹, Pedro Nacib Jorge Neto², Eunice Oba¹, Sony Dimas Bicudo¹.

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Botucatu/SP.

² IMV Technologies subsidiária Brasil, Campinas/ SP

Highlights

- Corpus luteum formation from follicular aspiration guided by laparoscopy in sheep
- Intrafallopian oocyte transfer of mature autologous oocyte *in vivo*, through artificial laparoscopic insemination in ovine species.

Abstract:

The aim of this study was to analyze the efficiency of the *corpus luteum* (CL) formed from laparoscopic ovum *pick-up* (LOPU) method in allowing the establishment and maintenance of pregnancy in sheep. The estrus of three ewes were synchronized using a vaginal device of medroxyprogesterone acetate for 14 days. In the fourth day of the hormonal treatment, the ewes received 125 µg of cloprostenol intramuscularly. The device was removed in the 14th day, and 300UI of the equine chorionic gonadotropin (eCG) was administered. After 48 h, the laparoscopic ovum pick up (LOPU) procedure of all visible follicles was performed in both ovaries of each ewe, followed by artificial insemination (AI) by laparoscopy

with diluted fresh semen, in the ipsilateral uterine horns of the ovary containing the greater aspirated follicle. The oocyte intrafallopian transfer (OIFT) of one cumulus-oocyte complexes (COC) autologous for the oviduct was performed in the same inseminated side of the uterine horns. Thereafter, the ewes were followed daily by transrectal ultrasonography (TRUS), and the progesterone plasma concentration (P4) was measured for a period of 18 days. Two CLs were formed in each of the three ewes that presented increasing progesterone production in the initial phase, with the progesterone levels stabilizing above 2 ng/mL. After 35 days of the oocytes transfer and AI, the pregnancy was confirmed by ultrasonography in two of the ewes and the lambing occurred through eutocic delivery after 151 and 153 days. With basis on these data, it is possible to conclude that LOPU in preovulatory moment promotes the formation of CLs with sufficient steroidogenic ability for allowing the normal development of gestation in sheep. The OIFT method demonstrated to be an efficient tool of assisted reproductive technology (ART) in this specie.

Keywords: Biotechnology, LOPU, Sheep, Pregnancy, Progesterone, Ultrasound.

1 - Introduction

The laparoscopic ovum *pick-up* (LOPU) is the main technique utilized to obtain the cumulus-oocyte complexes (COC) aiming *in vitro* embryo production (IVP) in sheep (Baldassarre et al., 1996; Stangl et al., 1999; Rodríguez et al., 2006; Padilha et al., 2014; Wieczorek et al., 2018). It has been demonstrated that, even performing consecutive LOPUs in a short period in the same animal, the procedure does not lead to macroscopic and microscopic alterations to the ovary and surroundings structures, that can interfere in the future fertility of the sheep (Teixeira et al., 2011). Beyond the objective of recovering COCs in sheep,

LOPU has been also utilized as a tool for the manipulation of the ovarian ambient, doing a mechanical control of the follicular population (Valasi et al., 2013; Denadai et al., 2017).

In equine (Bogh et al., 2000; Mozzaquatro et al., 2012, 2010) and bovine (Hayashi et al., 2006; O'Hara et al. 2012; Vernunft et al., 2013) the follicle aspiration leads to the formation of a functional corpus luteum (CL), characterized by the production of progesterone (P4). The induction of the formation of a CL in mares occurs more efficiently when a pre-ovulatory follicle is aspirated, resulting in a production of progesterone similar to a CL from a natural ovulation (Mozzaquatro et al., 2010). In bovine, the larger diameter of the aspirated follicle has a positive correlation with the luteum tissue area and the P4 production of the CL (Vernunft et al., 2013). When the follicular aspiration is performed during the luteal phase of the estrous cycle, it is not possible to observe the formation of a functional CL in both bovine (Hayashi et al., 2006) and equine (Bogh et al., 2000). The luteinizing hormone (LH) surge is determinant for the functional CL formation after the follicular aspiration. However, when follicular aspiration is performed in the follicular phase of estrous cycle, the CLs formation is not observed (Hayashi et al., 2006). In ovine, Valasi et al. (2013) performed follicular aspirations during the luteal phase of estrous cycle, and did not identify the formation of CLs using the ultrasonography, and the increase in progesterone levels.

Utilizing the superstimulatory treatment *one shot* described by Baldassarre et al. (1996), Denadai et al. (2017) and identified the formation of structures with similar ultrasonographic appearance to CLs after performing a LOPU of all

ovarian follicles at the moment of application of the gonadotrophines. However, their functionality was not characterized in this study.

The CL formation independent of the ovulation, opens the possibility of both CL formation and the development of a physiological pregnancy environment, where the female submitted to this procedure could be utilized with receptors in biotechniques as the gamete intrafallopian transfer (GIFT) and OIFT, this could occur without the presence of its COC, reducing the possibility of a unwanted pregnancy. Thus, the aims of this study were: 1) to evaluate the possibility of functional CLs formation from laparoscopic ovum *pick-up* (LOPU) at the pre-ovulatory moment, and; 2) to analyze if these structures are efficient for the adequate progesterone production, and the establishment and maintenance of pregnancy, after using the artificial insemination associated with oocyte intrafallopian transfer (OIFT) in sheep.

2 - Material and methods

2.1 Animals and treatment

The methods utilized in this experiment were in accordance with the ethical principles in the animal experimentation and certified by the Ethical commission ou committee? of animal use (CEUA) of the FMVZ-Unesp-Botucatu, protocol 0030/2017. The experiment was conducted during the spring, in the “Laboratory of Studies of Biotechnology Applied to Sheep and Goats Reproduction” and “Laboratory of Endocrinology” of Animal Reproduction Department and Animal Radiology”, of FMVZ – UNESP, Botucatu-S.P., situated at the 22°53'09” south latitude and 48°26'42” west longitude, and 804 m of altitude.

Three adult unleashed ewes with body condition scoring between 2.5 and 3.5 (BCS scale 1 to 5), adequate general clinical condition and reproductive

status were used in this study. During the experimental period the females were kept confined in a collective bin, with a daily diet composed by crushed elephant grass and 300 g of concentrate, and water and mineral salt *ad libitum*.

The ovaries of the ewes were monitored for dynamics of follicular growth and presence of the functional CL, with ultrasound examination performed daily for a seven days period before the hormonal treatment. The ewes those presented CL in at least one exam were considered in reproductive activity.

After ovarian cycling was observed by ultrasonography evaluation of the ovary during seven days, the ewes (n = 3) received an intravaginal device containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon®- Zoetis Brazil), which was maintained for 14 days. In the fourth day of treatment, the ewes received an intramuscular dose of 125 µg of cloprostenol (Ciosin® - Agner Unity Brazil) intramuscularly. The device removal was performed concomitantly with the administration of a 300 UI dose of equine chorionic gonadotropin - eCG (Novormon®- Zoetis Brazil). After 48 h of the eCG application, a LOPU of all ovarian follicle was performed, and the content of aspiration was taken to the laboratory for the identification and classification of the COCs with regard to the expansion of cumulus cells (CCs). Immediately after LOPU, the artificial insemination (AI) was performed, followed by the OIFT. The ultrasound monitoring of ovaries and the blood collection for determination of plasma concentration of progesterone (P4) started in the first day after the procedures, and were repeated at each 24 h during 18 days. Thirty-five days after the OIFT, an ultrasonography evaluation of the uterus was performed to confirm the gestation. (Figure 7)

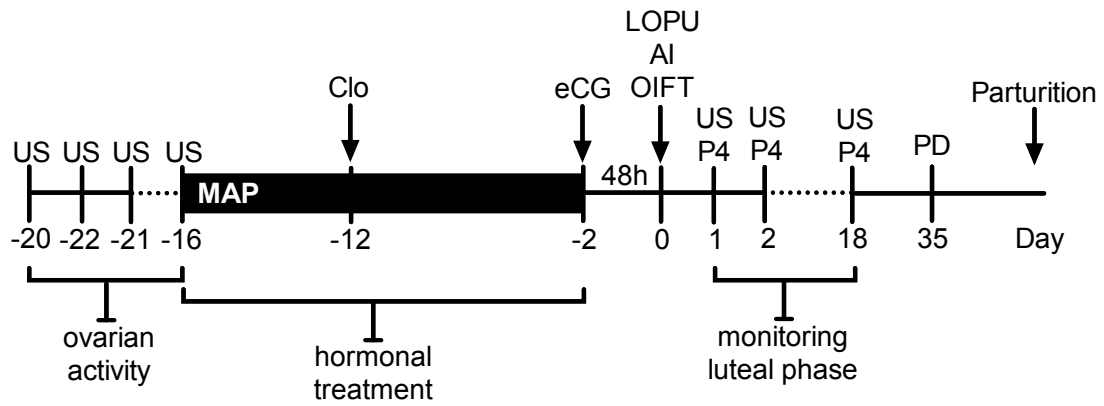


FIGURE 7 – Experimental design: Determination of ovarian activity, hormonal treatment, monitoring of the luteal phase, pregnancy detection, and parturition of the ewe during the experimental period. US (ultrasound examination); MAP (medroxyprogesterone acetate); Clo (cloprostenol); eCG (equine chorionic gonadotropin); LOPU (Laparoscopic ovum pick-up); AI (artificial insemination); OIFT (oocyte intrafallopian transfer); P4 (progesterone concentration); PD (pregnancy detection); h (hours); ↓ application or occurrence.

2.2 Laparoscopic ovum *pick-up* (LOPU)

A LOPU of all visible follicles were performed in both ovarians. The procedures for the laparoscopy and LOPU of ovarian follicles (Figure 8 – A and B) were the same to that described by Denadai et al. (2017).

2.3 Artificial insemination guided by laparoscopy

Immediately after the LOPU procedure, the semen of an adult ram with previously fertility evaluated was obtained trough andrologycal examination, utilizing and artificial vagina. After the collection, a macroscopic evaluation and the microscopy of the ejaculated using a dilution with Botubov® (Botupharma Animal Biotechnology - Brazil) were performed to verify its viability, determining a concentration of 200×10^6 viable spermatozoa per mL. The laparoscopic artificial insemination was performed in the ipsilateral uterine horn to the ovary containing the largest diameter aspirated follicle, in a volume of 0.5 mL, containing 100×10^6 viable spermatozoa. A standard Robetson pipette (Minitube®) was used to perforate the uterine horn in the greater curvature, depositing the seminal material in the uterine lumen.

2.4 Evaluation and processment of the cumulus-oocyte complexes (COC)

The fluid obtained from LOPU was taken to the laboratory, deposited in a Petri dish for the identification of COCs in an estereomicroscopic (Olympus SZ51®). The structures were transferred to drops of medium TCM-199, for the evaluation of the ooplasm characteristics and cumulus cels. A COC with the expansion of cumulus cels was aspirated to the interior of a tom cat catheter forming a liquid column of Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) containing the COC with 0.5 mL.

2.5 Oocyte Intrafallopian Transfer (OIFT)

The incision of skin, subcutaneous tissue, abdominal musculature and peritoneum, with approximately 1.5 cm, guided by laparoscopy was introduced by the incision of an atraumatic tweezers for grasping the tip of the uterine horn ipsilateral to the ovary containing the largest follicle aspirated, the tweezers was carefully drawn until its exposure. Then, a new traction was performed until exposure of the oviduct and location of the infundibular ostium. Thereafter, a COC was deposited in the interior of the ovidute, through the introduction of 4 to 8 cm of the tom cat catheter towards the ampoule (Figure 8 - C).

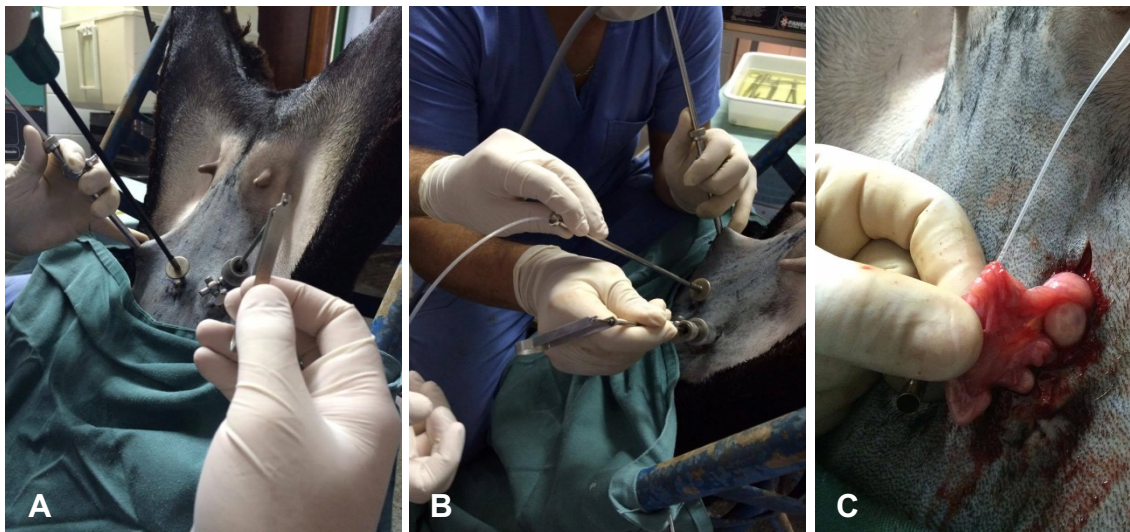


Figure 2 – A: Manipulation of the abdominal structures by laparocopy for the identification of uterus and ovaries. **B:** Follicle aspiration system inserted in the trocar for assess to the abdomen. **C:** Introduction of the tom cat catheter in the interior of ovidute.

2.6 Ultrasonography and pregnancy detection

The stool was removed and the rectal ampulla was filled by aqueous solution of carboxymethyl cellulose. An ultrasound Aloka® Prosound 2 VET, with linear frequency probe of 7.5 MHz (Model UST-660-7.5) was used to evaluate the ovaries and to identify the presence of CLs. The sonogram from the major structure section was used to measure the total area and the cavity area. The total area of the cavity was subtracted from the total area of the CL for the determination of the luteum area. The diagnostic of gestation was performed using the ultrasonographic evaluation of the uterus, being considered pregnant the animals in which the presence of the embryo and fetal envelopes were detected.

2.7 Determination of plasma concentration of progesterone

Blood samples were collected by jugular venipuncture in Vacutainers® (Becton Dickinson for Brazil) tubes containing anticoagulant (Ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA), and kept under refrigeration until centrifugation at 1200 x g for 10 minutes to obtain plasma, which was aliquoted into individual plastic tubes, identified and maintained at -20°C until the moment of hormonal determination.

The determination of plasma concentration of progesterone (ng/mL) was performed by radioimmunoassay (RIA) in solid phase, utilizing commercial kits (Beckman Coulter/IM1188) with elevated specificity for progesterone, with the Iod-125 being the trace radioactive element. The procedures for performing the dosages followed the manufacture's specifications. The counting of radioactivity

was performed in an automated gama counter (Perkin Elmer/WIZARD 1470 Automatic Gamma Counter).

3 - Results

3.1 Corpus luteum formation and development

The three ewes presented two CLs during the ultrasound examination period. The CLs were present during the 18 days of evaluation in two ewes, but it was not possible to visualize the CLs on one ewe in the 18th day. The three animals presented growing pattern in the first days, and stabilization between days 8 and 14, from which one ewe presented a regression pattern until the non identification of the CLs in the 18th day.

The plasma concentration of P4 was bellow 2 ng/mL in the first and second days, increasing gradually and maintaining the levels of 4-6 ng/mL between the days 6 and 10. In the ewe that presented regression of the luteum area, the concentration was kept bellow 2 ng/mL after the 12th day, and bellow 1 ng/mL in the days 16 and 17. In the other two ewes, the plasma concentration of P4 was higher than 2 ng/mL after the initial increase.

3.2 Pregnancy detection and lambing

The diagnostic of gestation by ultrasonography detected that two ewes presented pregnancy after 35 days of the OIFT. It was possible to visualize the concept and embrionary vesicle with ultrasonography characteristics adequate to the gestational age. However, one animal did not present any ultrasonographic signal of gestation. The two pregnant ewes delivered the lambs with 151 and 153 days after the OIFT.

The lambing occurred trough eutocic delivery and the lambs did not present clinical alterations at birth.

4 - Discussion

Similar to previously described in equine (Bogh et al., 2000; Hayna et al., 2006; Mozzaquatro et al., 2012, 2010) and bovine (Hayashi et al., 2006 O'Hara, 2012; Vernunft et al., 2013), we observed that in ovine species the follicular aspiration allowed the development of functional CLs. In ewes submitted to estrus synchronization, utilizing progestagens associated with eCG, the endogenous LH surge occurs removal of the exogenous source of P4 (Martinez-Ros et al., 2018; Soriano et al., 2018). In the present study the LOPU was purposely performed 48 h after the removal of the intravaginal device of medroxyprogesterone acetate and eCG administration, thus at a later time to the LH surge. Hypothetically, this factor may have been determinant for the occurrence of luteinization of the remaining structures after the aspiration and the efficient production of P4. In a similar manner, follicular aspirations performed after the endogenous LH surge in bovine, results in the formation of functional CLs. However, when this procedure is performed before the gonadotrophin surge, the CL is not formed (Hayashi et al., 2006).

In our study, OIFT was utilized in association with the artificial insemination. Thus, the sperm colonization of the oviduct followed a natural course, allowing the formation of an adequate population of spermatozoa in the local of fertilization, minimizing the possibility of polyspermy. In equine, the OIFT technique is well established, due to its efficiency in developing gestation (Riera et al., 2016; Hinrichs, 2018). In accordance with Carnevale (2004), if the aspiration of a pre ovulatory follicle is performed from a donor mare and the oocyte is surgically transferred to the interior of the oviduct of the recipient mare

previously submitted to the artificial insemination, it is possible to observe the gestational development.

It has been demonstrated that in goats the OIFT matured *in vitro* and deposited in the oviduct of a recipient goat between 10 and 20 h after the last artificial insemination presents fertilizing capacity (Cox et al., 2002). The OIFT of authologus in sheep after the artificial insemination performed in the present study resulted in both gestation and lambing in two of three ewes submitted to the procedure, demonstrating that the CLs produced after LOPU presented capacity of P4 production sufficient for the establishment and normal development of pregnancy.

The maternal recognition of pregnancy in ewe occurs by the *interon-tau* release (Roberts et al., 2008; Antoniazzi et al., 2013; Bazer et al., 2017). In the absence of gestation the prostaglandin $F_2 \alpha$ ($PGF_2 \alpha$) produced by the endometrium is responsible by the regression of the CL (Pexton et al., 1975). During the estrous cycle the luteolysis contemplates the functional loss with the reduction of P4 production between the 12th and 14th days, and morphological regression that begins in the 15th day with diminished ultrasonographic visibility of the structure (Rickard et al., 2017). The non-pregnant ewe presented plasmatic P4 concentrations lower than 2 ng/mL from the 12th day after LOPU, reduced luteum area from the 15th day, and ultrasonographic visibility loss in the 18th day. The pregnant ewes did not present regression of the luteum area and maintained the P4 concentration above 2 ng/mL during the whole observation period, after the initial increase.

The gestation period observed in the present study is in accordance with Valasi et al. (2017) (140-155 days). Some factors such as the age, body weight

and the prolificacy can interfere in the duration of gestation (Ozturk e Aktaş, 1996). It was not observed any alteration in the lambs born from the OIFT in this study, as well as the gestation period. However, more studies are necessary to evaluate the potential of impact of using CL from LOPU on the productivity of the sheep, as well as the development of a system that allows a greater application of OIFT in these animals, as a possible tool for multiplication of genetically superior animals.

6 - Conclusion

Considering the described in this study, it can be concluded that, in sheep, the CL formed from LOPU of pre ovulatory follicle presents secretory capacity that allow the establishment of normal gestation. Although the OIFT in the ewe has been little studied, it looks promising to be utilized in assisted reproductive technology (ART) in this species.

6 - References

- Antoniazzi, A.Q., Webb, B.T., Romero, J.J, Ashley, R.L., Smirnova, N.P., Henkes, L.E., Bott, R.C., Oliveira, J.F., Niswender, G.D., Bazer, F.W., Hansen, T.R., 2013. Endocrine Delivery of Interferon Tau Protects the Corpus Luteum from Prostaglandin F2 Alpha-Induced Luteolysis in Ewes. *Biology of Reproduction*, 88, 1–12. doi: 10.1095/biolreprod.112.105684
- Baldassarre, H., Fumus, C.C., Matos, D.G., Pessi, H., 1996. *In Vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, 45, 707-717. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00417-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00417-7)

- Bazer, F.W., Wu, G., Johnson, G.A., 2017. Pregnancy recognition signals in mammals: the roles of interferons and estrogens. *Animal Reproduction*, 14, 7-29. doi: [10.21451/1984-3143-AR888](https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR888)
- Bogh, I.B., Hoier, R., Synnøstvedt, B., Greve, T., 2000. Steroid concentration in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology*, 54, 877–888. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00398-8)
- Carnevale, E.M., 2004. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*. 82-83, 617-624. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.002>
- Cox, J.F., Zavala, A., Saravia, F., Rivas, C., Alfaro V., 2002. Fertilization efficiency of in vitro matured oocytes transferred to oviducts of inseminated goats: A model to assess in vivo fertilization performance of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 58, 1-8. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00918-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00918-4)
- Denadai, R., Leite, H.R., Bicudo, L., Rodello, L., Oba, E., Bicudo, S.D. 2017. Pattern of follicular development in sheep subjected to ovarian superstimulation after follicular ablation by laparoscopic ovum pick-up. *Ciência Rural*, 47, e20150704. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150704>
- Hayashi, K.G., Matsui, M., Acosta, T.J., Kida, K., Miyamoto, A., 2006. Effect of the Dominant Follicle Aspiration before or after Luteinizing Hormone Surge on the Corpus Luteum Formation in the Cow. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 129-135. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.17049>
- Hayna, J.T., Madill, S., Roser, J.F., Troedsson, M.H.T., 2006. The effect of

transvaginal aspiration of small and medium sized follicles on serum progesterone, FSH and LH concentrations in mares. *Animal Reproduction Science*, 94, 355-356. doi: [10.1016/j.anireprosci.2006.03.070](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.070)

Hinrichs K., 2018. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 25, 80-93. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.13259>.

Martinez-Ros, P., Astiz, S., Garcia-Rosello, E., Rios-Abellan, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2018. Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Animal Reproduction Science*, 197, 317-323. doi: [10.1016/j.anireprosci.2018.08.046](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.046)

Mozzaquatro, F.D, Verstegen, J.P., Douglas, R.H., Troedsson, M.H., DeLaCorte, F.D., Silva, C.A., Rubin, M.I., 2010. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. *Animal Reproduction Science*, 119, 56–62. doi: [10.1016/j.anireprosci.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.012)

O'Hara, L., Scully, S., Maillo, V., Kelly, A. K., Duffy, P., Carter, F., Forde, N., Rizos, D., Lonergan, P., 2012. Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating. *Reproduction*, 143, 673-682. doi: [10.1530/REP-11-0505](https://doi.org/10.1530/REP-11-0505).

Ozturk. A., Aktas A. H., 1996. Effect of environmental factors on gestation length in Konya Merino sheep. *Small Ruminant Research*, 22, 85-88. doi: [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(96\)00874-7](https://doi.org/10.1016/0921-4488(96)00874-7)

Padilha, L,C, Teixeira, P,P, Pires-Buttler, E,A, Apparício, M, Motheo, T,F, Savi, P,A, Nakaghi, E,Y, Alves, A,E, Vicente, W,R, 2014. In vitro maturation of

oocytes from Santa Ines ewes subjected to consecutive sessions of follicular aspiration by laparoscopy. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 243-248. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12261>

Pexton, J.E, Weems, C.W., Inskeep, E.K., 1975. Prostaglandin F in uterine venous plasma, ovarian arterial and venous plasma, and in ovarian and luteal tissue of pregnant and nonpregnant ewes. *Journal of Animal Science*, 41, 154–159. doi:[10.2527/jas1975.411154x](https://doi.org/10.2527/jas1975.411154x)

Rickard, J.P., Ryan, G., Hall, E., Simon Paul de Graaf, S.P. Robert Hermes, R., 2017. Using transrectal ultrasound to examine the effect of exogenous progesterone on early embryonic loss in sheep, PLoS One, 12, e0183659. doi: [10.1371/journal.pone.0183659](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183659)

Riera, F.L., Roldán, J.E., Gomez, J., Hinrichs, K., 2016. Factors affecting the efficiency of foal production in a commercial oocyte transfer program. *Theriogenology*, 85, 1053-1062. doi: [10.1016/j.theriogenology.2015.11.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.016)

Roberts, R.M., Chen, Y., Ezashi, T., Walker, A.M., 2008. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Seminar in Cell & Developmental Biology*, 19, 170-177. doi: [10.1016/j.semcd.2007.10.007](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.10.007)

Rodríguez, C, Ane, I.L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Chamorro, C.A., de Paz, P., 2006. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 106-113. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x>

Soriano, G.A.M., de Ruediger, F.R., Zundt, M., Gomes, M.A.D.C.N., de Souza, L.F.A., Giometti, I.C., de Paula Nogueira, G., Zanelli, G.R., de Almeida Rego, F.C., Castilho, C., 2018. Characterization of the LH peak after short and long fixed-time artificial insemination protocols in sheep raised in the tropics. *Animal Science Journal*, 89, 1245-1252. doi: 10.1111/asj.13051.

Stangl, M., Kühholzer, B., Besenfelder, U., Brem G, 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, 52, 709-716.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00164-8)

Teixeira, P.P., Padilha, L.C., Oliveira, M.E., Motheo, T.F., da Silva, A.S., Barros, F.F., Coutinho, L.N., Flôres, F.N., Lopes, M.C., Bandarra, M.B., Silva, M.A., Vasconcelos, R.O., Rodrigues, L.F., Vicente, W.R., 2011. Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, 127, 169-175.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.001>

Valasi, I., Theodosiadou, E., Fthenakis, G.C., Papanikolaou, T., Deligiannis, C., Kalogiannis, D., Chadio, S., Amiridis, G.S., 2013. Endocrinological profile and follicular development in cyclic ewes subjected to repeated ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 138, 180–187.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.026>

Valasi, I., Barbagianni, M.S., K.S.Ioannidi, K.S., Vasileiou, N.G.C., Fthenakis, G.C., Pourlis, A., 2017. Developmental anatomy of sheep embryos, as assessed by means of ultrasonographic evaluation. *Small Ruminant Research*, 152, 56-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.016>

Vernunft, A. Weitzel, J.M., Viergutz, T., 2013. Corpus luteum development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows. *Veterinarni Medicina*, 58, 221–229.

Wieczorek, J., Koseniuk, J., Cegla, M., 2018. The repeatable method of laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep: clinical aspects and efficiency of the method. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21, 803–810.
doi:10.24425/pjvs.2018.125603

Capítulo 3

1- Considerações finais

A funcionalidade do corpo lúteo (CL) é fundamental para desenvolvimento da gestação, e a possibilidade da formação desta estrutura através da aspiração folicular guiada por laparoscopia (LOPU) na espécie ovina, permite a formação de um CL sem a presença do oócito autólogo no interior do oviduto, como acontece na ovulação espontânea onde o complexo cúmulos oócito (COC) é liberado, captado pelas fimbrias e passível de fertilização. O desenvolvimento desse conhecimento possibilita a utilização desta ovelha como receptora em técnicas como a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) ou a transferência intrafalopiana de oócitos (OIFT), sem haver riscos de que a presença do COC da receptora possa levar a produção de um cordeiro indesejável.

As técnicas de reprodução assistidas usualmente empregadas em ovinos, que possibilitam a multiplicação do material genético de fêmeas de interesse zootécnico, como múltiplas ovulação para transferência de embriões (MOET) não estão isentas de riscos de induzirem à formação de aderências viscerais nas doadoras. A PIV em particular requer laboratórios de média complexidade, com equipamentos de alto valor econômico além de estar sujeita a resultados com baixos índices de produção de embriões e gestação. A utilização da OIFT em receptoras pode viabilizar a multiplicação de material genético de doadoras, com baixo risco, por ser a LOPU menos invasiva e exigir laboratórios de baixa complexidade, podendo ser realizada em condições de campo.

Além disso a OIFT possibilitaria o desenvolvimento de gestação a partir dos COCs da doadora sem a necessidade de realizar todas as etapas da PIV, podendo utilizar apenas a maturação *in vitro* (MIV), no caso de COCs imaturos, ou mesmo dispensar o uso da MIV, no caso de COCs oriundos de folículos pré-ovulatórios, exigindo, portanto, laboratórios de baixa complexidade, podendo mesmo ser realizadas em condições de campo. A potencial redução nos custos para produção dos cordeiros a partir dos COCs de doadoras de interesse zootécnico pode viabilizar a adoção dessa fermenta biotecnológica em programas de melhoramento genético.

A técnica de transferência de células para o interior da cavidade de folículos aspirados, desenvolvida neste estudo, apresenta potencial de

inovações tecnológicas na formação de CLs, por permitir novos avanços como a transferência de células da granulosa cultivadas *in vitro*, ou de células tronco autólogas, ampliando a aplicação tecnológica da técnica, ou permitindo o uso de terapias celulares em fêmeas com formação inadequada do CL.

2 - Conclusão

A partir dos resultados apresentados nos dois experimentos deste estudos pode-se concluir que a LOPU dos folículos ovarianos de ovelhas em momento próximo a ovulação resulta em formação de CLs funcionais, porém com área lútea individual menor que daqueles formados a partir de ovulação espontânea. A aspiração concomitante de todos os folículos visíveis em ambos os ovários, induzir à formação de CLs acessórios, resultando em área lútea total superior, porém com produção de P4 similar àquele CL formado a partir de ovulação espontâneas, e ovelhas com CLs decorrentes de LOPU apresenta capacidade secretória que permite o desenvolvimento de gestação normal. A reposição de células autólogas presentes no fluido obtido pela LOPU, leva a formação de uma HCE ao ultrassom, com ecotextura e ecogenicidade similares a do CL, sugerindo uma possível luteinização. A OIFT é ainda uma técnica pouco estudada em ovinos, porém se apresenta promissora quanto sua aplicação em biotécnicas da reprodução assistida nesta espécie.

Mais estudos se fazem necessários para avaliação do CL oriundo de LOPU, visando avaliar aspectos de morfofuncionalidade como arcabouço citohistológico, vascularização da estrutura e potencial de impacto do emprego de CL oriundos de LOPU sobre a produtividade em ovelhas bem como o desenvolvimento de um sistema que permita maior aplicação da OIFT em ovinos, como possível ferramenta de multiplicação de animais geneticamente superiores.