

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**RESPOSTA FOLICULAR OVARIANA E PRODUÇÃO  
OOCITÁRIA DE CABRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS  
DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA**

**Claudinéia Silva Mendes**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

# **RESPOSTA FOLICULAR OVARIANA E PRODUÇÃO OOCITÁRIA DE CABRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA**

**Claudinéia Silva Mendes**  
**Medicina Veterinária**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Nutrição e Alimentação Animal/Produção Animal).

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pires Barbosa  
**Coorientador:** Dr. Lincoln da Silva Amorim

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M538r

Mendes, Claudinéia Silva.

Resposta folicular ovariana e produção oocitária de cabras submetidas a protocolos de estimulação ovariana / Claudinéia Silva Mendes.\_ Cruz das Almas, BA, 2016. 36f.; il.

Orientadora: Larissa Pires Barbosa.

Coorientador: Lincoln da Silva Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Ovino – Reprodução animal. 2.Cabras – Folículo ovariano. 3.Oócitos – Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.089

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**RESPOSTA FOLICULAR OVARIANA E PRODUÇÃO OOCITÁRIA DE  
CABRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO  
OVARIANA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação  
Claudinéia Silva Mendes

Aprovada em: 29 de abril de 2016

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pires Barbosa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientadora

Prof. Dr. Misael Caldas Nascimento  
União Metropolitana para o Desenvolvimento da Educação e Cultura  
Examinador Externo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mabel Freitas Cordeiro  
Universidade Federal do Vale do São Francisco  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

Dedico, àqueles que mesmo com pouco estudo, com mãos calejas do trabalho e o suor no rosto, sempre me estimularam a seguir nos estudos e me ensinaram o valor do trabalho. Aos meus queridos pais, amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, sem ele nada seria possível ou teria existido.

Aos meus pais, EDELILTON e NIVANDY, meus exemplos de vida e que sempre me apoiaram na busca pelos meus sonhos. Amo vocês!

À minha irmã EVANÉIA e meu cunhado LEANDRO, pela amizade e apoio em minha trajetória. Amo vocês!

Ao meu esposo BIANOR, pelo companheirismo, confiança, paciência, sempre me incentivando a seguir e correr atrás, que tudo vai dar certo. Saiba que muito do que aprendi em Laparoscopia devo aos seus ensinamentos. Te amo, MEU BEM!

Ao meu sogro, Sr. MANINHO e minha sogra, Dn. NILZA, pelo carinho, apoio e concessão dos animais experimentais.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> LARISSA, pela orientação, confiança, amizade, oportunidade de ter vivido e convívio não só com essa profissional de excelência, mas com uma pessoa de um coração enorme e sempre com sorriso largo no rosto contagiante, que nos motiva a seguir nesta caminhada. Obrigada, PRÓ!

Aos bravos estagiários da reprodução, LAURA, CALINE, JESSICA, ÁUREO, POLIANA e WILLIAN, que trabalharam dias no sol a pino e a noite, com uma energia contagiante, me ajudando na organização, na execução, coleta dos dados e manejo dos animais experimentais. Valeu galera, são nota 10, nada seria possível sem a ajuda de vocês!

Aos amigos da Pós-graduação, MONNA, MAICON, EMMANUEL, KAZUMI e SANDRA, pelo convívio, momentos de descontração, oportunidade de aprendizado e o grande apoio durante esta caminhada. Valeu GALERA!

Ao meu coorientador LINCOLN DA SILVA AMORIM, pela participação e apoio durante a capacitação da técnica de aspiração folicular ovariana e execução da etapa experimental, além das contribuições técnicas e científicas para realização desse trabalho. Valeu BINHO!

À professora MABEL FREITAS CORDEIRO (UNIVASF), pela acessibilidade e disponibilidade em passar sua experiência com aspiração folicular ovariana em caprinos e contribuições científica na participação da Comissão Examinadora desta dissertação.

Ao professor MISAEL CALDAS NASCIMENTO (UNIME), pela amizade, confiança, concessão de equipamento para experimentação de campo e satisfação em contribuir cientificamente na composição da Comissão Examinadora deste trabalho. Valeu MISA!

À medica veterinária MARIANA ANDRADE e a zootecnista ANA LÚCIA, pela amizade, carinho mesmo quando estão distantes e às grandes contribuições nesta dissertação.

Aos professores da UFRB, FABIANA LANA e CARLOS RAMOS, pelo convívio, disponibilidade, aprendizado e contribuição nas análises estatísticas.

À prof<sup>a</sup>. VANESSA CASTRO e aos médicos veterinários ÉLEN SOUZA e MANOEL ROSA, pelo apoio e contribuição nos procedimentos anestésicos durante o treinamento de aspiração folicular e execução da experimentação de campo.

Ao professor CARLOS HENRIQUE MELO (INTA), pela disponibilidade e acessibilidade em passar seus conhecimentos da técnica de aspiração folicular por laparoscopia, foram grandes contribuições para realização desta dissertação. Muito obrigada!

Ao médico veterinário CARMO, pelos conselhos e contribuição técnico-científica nesta jornada. Valeu, CARMINHO!

À PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA ANIMAL da UFRB pelo aprendizado e colaboração nesta dissertação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo.

Enfim, só tenho a agradecer a todos que me apoiaram e contribuíram neste trabalho. Essa dissertação é uma vitória nossa!

## EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a determinação e a persistência para um objetivo, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis”

José Martiniano de Alencar

## RESPOSTA FOLICULAR OVARIANA E PRODUÇÃO OOCITÁRIA DE CABRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA

**RESUMO:** O estudo teve como objetivo avaliar a resposta folicular ovariana e a produção oocitária de cabras submetidas a protocolos de estimulação ovariana. Foram realizadas duas etapas experimentais com 24 e 18 animais, respectivamente, distribuídos aleatoriamente em esquema fatorial 2x2, com avaliação dos efeitos: duração do protocolo hormonal (sete ou doze dias) e número de aplicações de hormônio foliculo estimulante (FSH) (uma ou cinco doses). Todos os animais receberam esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona por um período de sete dias (protocolo curto) ou doze dias (protocolo longo), com aplicação de 125µg de cloprostenol, 72 horas antes da retirada das esponjas. Para estimulação ovariana foi aplicado 120mg de FSH em dose única, 36h antes da aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) ou em cinco doses (30/30; 20/20 e 20mg), em intervalos de 12h, com última dose aplicada 36h antes da LOPU. Na primeira etapa foram realizadas ultrassonografias seriadas no dia 0 (D0); D3/D8; D4/D9; D5/D10 e D6/D11, respectivamente para os protocolos curtos e longos, para acompanhamento da resposta ovariana aos tratamentos hormonais. Na segunda etapa, os animais foram submetidos à LOPU, para determinação do número de folículos visualizados; aspirados entre 2 a 7mm de diâmetro; número de complexo cumulus oócito (COCs) recuperados; taxa de recuperação; classificação morfológica dos COCs (Grau 1, 2, 3 e 4) e a taxa de COCs viáveis para produção de embrião *in vitro*. Na primeira etapa os dados foram avaliados por Modelos Lineares Generalizados e na segunda por Análise de Variância a 5% de probabilidade. Não houve efeito dos fatores e de interação ( $P>0,05$ ) para número de folículos na avaliação do D0 e D3/D8. Contudo, na avaliação do D6/D11 (momento da LOPU), houve efeito ( $P<0,05$ ) do fator duração do protocolo para número de folículos pequenos, com  $1,05\pm 0,62$  folículos no protocolo curto e ausência desses folículos no longo. Houve efeito do número de doses de FSH para os folículos das categorias médio e grande, com maior número de folículos médios para dose única ( $6,49\pm 1,45$ ) e de folículos grandes ( $7,97\pm 1,61$ ) para múltiplas doses. Não houve efeito dos fatores e de interação ( $P>0,05$ ) para o diâmetro dos folículos grande, médio e pequeno, exceto para avaliação realizada no momento da quarta aplicação do FSH nos protocolos com cinco doses (D4/D9), com efeito de interação para folículo grande ( $P<0,05$ ). Na segunda etapa não foram verificados efeitos dos fatores e nem de interação ( $P>0,05$ ) para número de folículos visualizados ( $16,9\pm 8,01$ ) e aspirados ( $12,2\pm 5,6$ ); número de COCs recuperados ( $8,1\pm 4,6$ ); taxa de recuperação ( $65,0\pm 18,7\%$ ); qualidade morfológica dos COCs em grau 1 ( $4,3\pm 4,4$ ), grau 2 ( $2\pm 1,5$ ), grau 3 ( $1,2\pm 1,1$ ) e grau 4 ( $0,4\pm 0,5$ ) e na taxa de COCs viáveis ( $92,1\%$ ). Contudo, os quatro protocolos foram eficientes em estimular a resposta ovariana e a produção oocitária de cabras, porém seria mais indicada a utilização do protocolo curto (7 dias) e aplicação de dose única de FSH, com base no maior número de folículos médios disponíveis para aspiração, além do menor tempo e maior praticidade de execução.

**Palavras chave:** Aspiração folicular por laparoscopia; Complexo cumulus oócito; Hormônio foliculo estimulante

## FOLLICULAR OVARIAN RESPONSE AND OOCYTES PRODUCTION GOATS SUBMITTED TO PROTOCOLS OF OVARIAN STIMULATION

**ABSTRACT:** The study aimed to evaluate the ovarian follicular response and the production of goat oocytes undergo ovarian stimulation protocols. There were two experimental stages 24 and 18 animals respectively randomized in a 2x2 factorial design, with assessment of the effects: duration of hormonal protocol (six or twelve days) and number of follicle stimulating hormone applications (FSH) (one or five doses). All animals received intravaginal sponges impregnated with 60mg of medroxyprogesterone acetate (MAP) over the period of six (short protocol) or twelve days (long protocol), applying 125µg cloprostenol, 72 hours before removal of the sponges. For ovarian stimulation was applied FSH 120mg single dose 36h before laparoscopic ovum pick-up (LOPU) or five doses (30/30; 20/20 and 20mg) in 12 hour intervals, with the last dose applied 36h before LOPU. In the first step, were performed serially ultrasound on day 0 (D0); D3/D8; D4/D9; D5/D6 and D10/D11, respectively, for the short and long protocols, for monitoring of ovarian response to hormonal treatments. In the second stage, the animals were subjected to LOPU for determining the number of follicles visualized and aspirates those from 2 to 7mm in diameter; number of cumulus oocyte complex (COCs) recovered; recovery rate; morphological classification of COCs (Grade 1, 2, 3 and 4) and the rate of viable COCs for use in vitro embryo production. In the first stage the data were evaluated by Generalized Linear Models and the second by analysis of variance at 5% probability. There was no effect of the factors and interaction ( $P > 0.05$ ) for number of follicles in the evaluation of D0 and D3/D8. However, the evaluation D6/D11 (time of LOPU) was effect ( $P < 0.05$ ) the duration of the protocol factor for number of small follicles, with  $1.05 \pm 0.62$  in the short protocol and absence of these follicles in the long protocol. There was effect of the number of doses of FSH to the follicles of medium and large categories, with the largest number of medium follicles single dose ( $6.49 \pm 1.45$ ) and large follicles ( $7.97 \pm 1.61$ ) for multiple doses. There was no effect of the factors and interaction ( $P > 0.05$ ) to the diameter of the large, medium and small follicles, except for assessment made at the fourth application of FSH in the protocols with five doses (D4 / D9) with effect of interaction for large follicles ( $P < 0.05$ ). In the second stage, there was no effects of factors or interaction ( $P > 0.05$ ) for number of follicles visualized ( $16.9 \pm 8.01$ ) and aspirates ( $12.2 \pm 5.6$ ); number of recovered COCs ( $8.1 \pm 4.6$ ); recovery rate ( $65.0 \pm 18.7\%$ ); morphological quality of COCs in grade 1 ( $4.3 \pm 4.4$ ), grade 2 ( $2 \pm 1.5$ ), grade 3 ( $1.2 \pm 1.1$ ), grade 4 ( $0.4 \pm 0.5$ ) and COCs viable rate (92.1%). Four protocols were effective in stimulating ovarian response and oocyte production in goats, however, would be more suitable to use the short protocol (7 days) and application of a single dose of FSH, based on the largest number of medium follicles available for aspiration, in addition to the shorter time and more practical implementation.

**Key words:** Follicle stimulating hormone; Laparoscopic ovum pick-up; Oocyte cumulus complex

## LISTA DE ABREVIATURAS

MAP	Acetato de medroxiprogesterona
RNA	Ácido ribonucleico
ANOVA	Análise de variância
Cm	Centímetro
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COC	Complexo <i>cumulus</i> oócito
CIDR®	Dispositivo interno de liberação controlada de progesterona
R	Correlação linear de Pearson
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
D	Dia
ECC	Escore de condição corporal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
G	Gramma
°C	Grau Celsius
H	Hora
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHe	Hormônio folículo estimulante de origem equina
FSHp	Hormônio folículo estimulante de origem suína
LH	Hormônio luteinizante
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IM	Intramuscular
PVPI	Iodopovidona
Kg	Kilograma
LOPU	Aspiração folicular por laparoscopia
≥	Maior ou igual
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
µg	Micrograma
Mg	Miligrama

mL	Mililitro
Mm	Milímetro
GLM	Modelo linear generalizado
Ng	Nanograma
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embrião
P <sub>4</sub>	Progesterona
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandina F <sub>2</sub> α
REGF	Receptor do fator de crescimento epidermal
SRD	Sem raça definida
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de embriões
UTR	Ultrassonografia em tempo real
UI	Unidade internacional

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais eventos que ocorrem durante uma onda folicular ovulatória: recrutamento, seleção, dominância e ovulação .....	5
Figura 2. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a Etapa Experimental .....	13
Figura 3. Protocolos hormonais e momento das avaliações ultrassonográficas ....	14
Figura 4. Temperatura média e umidade relativa do ar durante a etapa experimental II.....	16
Figura 5. Diâmetro dos folículos pequenos visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante .....	24
Figura 6. Diâmetro dos folículos médios visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante .....	25
Figura 7. Diâmetro dos folículos grandes visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante .....	26
Figura 8. Diâmetro dos folículos grandes visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante .....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de classificação de complexos <i>cumulus</i> oócito (COC) recuperados a partir de cabras criadas no Nordeste do Brasil.....	19
Tabela 2. Número de folículos ovariano pequenos, médios e grandes de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante visualizados por ultrassonografia.....	20
Tabela 3. Número de folículos ovariano pequenos, médios e grandes visualizados por ultrassonografia no momento da LOPU de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante .....	22
Tabela 4. Número de folículos visualizados, aspirados e COCs recuperados de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação de dose única ou de cinco doses de hormônio folículo estimulante.....	29
Tabela 5. Qualidade dos COCs recuperados e viáveis para produção <i>in vitro</i> de embriões de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação de dose única ou cinco doses de hormônio folículo estimulante.....	30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Dinâmica folicular em caprinos .....	3
2.2 Estimulação hormonal ovariana para aspiração folicular em caprinos .....	7
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1 Etapa Experimental I .....	12
3.2 Etapa Experimental II .....	15
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
4.1 Etapa Experimental I .....	20
4.2 Etapa Experimental II .....	288
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>322</b>
<b>INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES</b> .....	<b>366</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil se destaca no mercado internacional como referência na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos, sendo o maior produtor mundial, com 366.517 embriões produzidos, correspondendo a 70% do total mundial (IETS, 2014). Já nos pequenos ruminantes, a PIV apresenta um cenário de evolução, mas ainda buscando consolidação dos procedimentos em todo mundo (PARAMIO, 2010). Nestes animais, um fator que possibilitou a expansão desta biotecnologia, tanto nas pesquisas quanto para fins comerciais, foi à obtenção de oócitos *in vivo* pela técnica de aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) (BALDASSARRE, 2012).

Com essa técnica a disponibilidade de grande número de oócitos de boa qualidade aumenta, influenciando diretamente no desempenho das etapas posteriores (BALDASSARRE, 2012), além de ser pouco invasiva, de rápida execução e recuperação pós cirúrgica (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Neste contexto, quando a LOPU é associada à PIV, tornam-se biotecnologias de grande interesse comercial, devido a utilização de fêmea de alto valor genético, com diminuição do intervalo entre gerações, produção de grande número de descendentes, utilização de fêmeas pré-púberes, até mesmo para a formação de banco de germoplasma para espécies ameaçadas de extinção (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

Com o intuito de melhorar o número e a qualidade dos oócito recuperados por sessão de LOPU na espécie caprina, os protocolos a base de progestágenos com duração longa são utilizados tradicionalmente, consiste no uso de implantes por um período de 10 a 11 dias (BALDASSARRE, 2002; SOUZA-FABJAN *et al.*, 2013; AVELAR *et al.*, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2014). Entretanto, a utilização dos protocolos curtos já foi proposta em ovinos por Teixeira *et al.* (2011), fundamentados na hipótese de que os tratamentos longos resultariam em concentrações subluteais de progesterona, favorecendo a persistência e o crescimento excessivo do folículo dominante.

Associado ao uso dos progestágenos, as prostaglandinas e diferentes doses e número de aplicações do hormônio folículo estimulante (FSH) e/ou da gonadotrofina coriônica equina (eCG) estão sendo utilizadas para se obter a máxima produção de oócitos viáveis por sessão (BALDASSARRE, 2002; SOUZA-FABJAN *et al.*, 2013; AVELAR *et al.*, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2014), com o propósito de simplificar a execução dos protocolos de estimulação ovariana sem comprometer a resposta dos animais tratados (SOUZA *et al.*, 2011a).

Desta forma, o estudo teve como objetivo avaliar a resposta folicular ovariana e a produção oocitária de cabras submetidos a protocolos de estimulação ovariana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dinâmica folicular em caprinos

Os avanços nos estudos da fisiologia do ciclo estral e entendimento do processo dinâmico de crescimento folicular em caprinos, só foi possível devido à utilização da ultrassonografia em tempo real (UTR). O primeiro estudo realizado por Ginther e Kot (1994), utilizou ultrassonografia transretal para exame dos ovários em cinco cabras da raça Saanen, possibilitou acompanhar o desenvolvimento folicular durante quatro intervalos interovulatórios, permitindo monitorar o crescimento e a regressão de folículos ovarianos, por meio de sucessivas observações.

A UTR é uma técnica confiável e não invasiva que possibilita os estudos de dinâmica folicular e luteal. Segundo Simões *et al.* (2006), ela pode ser utilizada para medição e classificação de folículos  $\geq 3\text{mm}$ , ou na identificação e avaliação morfológica do corpo lúteo, sete a oito dias após ovulação, apresentando elevada precisão e uma especificidade de 100%. É um importante instrumento para a compreensão da fisiologia e causas de infertilidade reprodutiva, na determinação do momento ideal para realizar a inseminação artificial e no estabelecimento e avaliação do controle estral dos protocolos hormonais (SIMÕES *et al.*, 2005).

Na sua maioria, os trabalhos utilizando UTR em cabras foram realizados por via transretal, porém Tenório Filho *et al.* (2007) realizaram um estudo em cabras Anglo Nubianas durante dois ciclos estrais, por via transvaginal com auxílio de transdutor microconvexo e verificaram um menor desconforto animal, visualização mais rápida dos ovários e maior qualidade das imagens quando comparado ao transdutor linear.

O ciclo estral em caprinos dura em média 21 dias, sendo que neste período os ovários passam por uma série de alterações morfológicas e processos bioquímicos controlados principalmente pelo mecanismo endócrino composto por gonadotrofinas e os esteroides secretados pelos folículos

ovarianos (FATET *et al.*, 2011), além dos fatores de crescimento e peptídeos (MAGALHÃES *et al.*, 2009). Esse conjunto de alterações cíclicas na gônada é denominado de ciclo ovariano (FATET *et al.*, 2011).

Este ciclo ovariano é classicamente dividido em duas fases: a fase folicular (5 dias) e a fase lútea (16 dias) (FATET *et al.*, 2011). A fase folicular ou estrogênica consiste no período onde ocorre o crescimento dos folículos antrais estimulados pela liberação pulsátil do FSH e do hormônio luteinizante (LH), culminando na ovulação, devido às baixas concentrações plasmáticas de progesterona decorrente da luteólise do corpo lúteo do ciclo anterior, promovida pela prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

Na fase lútea ou progesterônica ocorre o contínuo crescimento folicular dependente das gonadotrofinas (FSH e LH) em forma de ondas, porém a ovulação é inibida pela progesterona produzida pelo corpo lúteo formado após a ovulação, os folículos dessas ondas entram em atresia decorrente da diminuição da pulsatilidade de FSH e da ausência do pico de LH (FATET *et al.*, 2011). Esses eventos se repetem ciclicamente, até que a luteólise seja impedida pelo reconhecimento materno da gestação (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

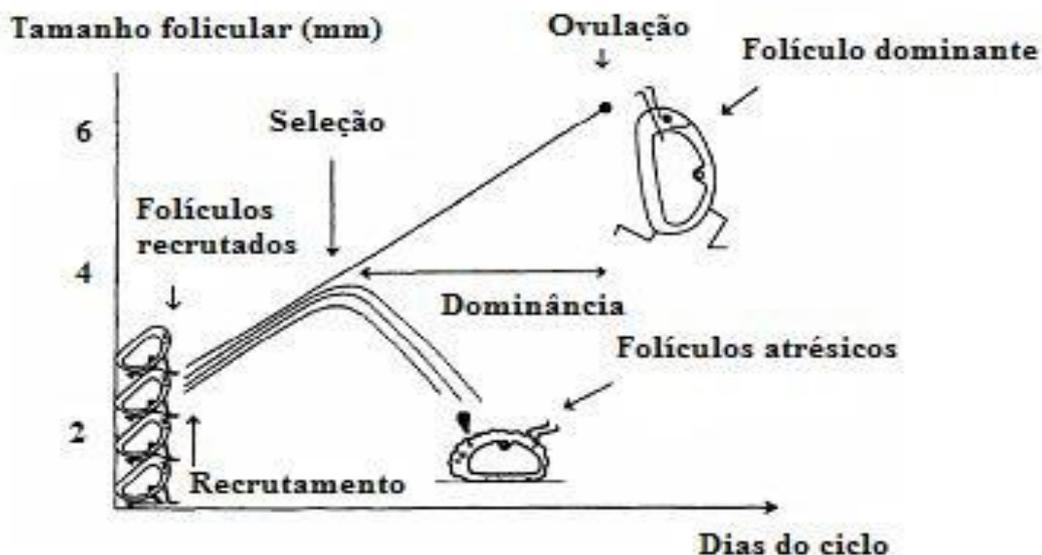
O crescimento dinâmico folicular na espécie caprina ocorre em forma de ondas durante todo o ciclo estral, inclusive na fase lútea, segundo Ginther e Kot (1994) e Haldar e Ghosh (2015). Ginther e Kot (1994) e Simões *et al.* (2006) relatam que o padrão de desenvolvimento folicular durante o ciclo estral em cabras apresentou quatro ondas foliculares, com variação na sua duração em cada ciclo estral avaliado, já Uribe-Velásquez *et al.* (2015) observaram três ondas de crescimento folicular. Porém, Tenório Filho *et al.* (2007) encontraram uma variação de três a quatro ondas por ciclo ovariano.

Segundo Uribe-Velásquez *et al.* (2015), a emergência da onda folicular em cabras é marcada pelo aparecimento de um *pool* de pequenos folículos com diâmetro médio de três a quatro milímetros, que darão origem aos folículos com diâmetro maior igual a cinco milímetros. Nos pequenos ruminantes o intervalo de emergência de cada onda folicular ocorre a cada quatro a sete dias (RUBIANES e MENCHACA, 2003; TENÓRIO FILHO *et al.*, 2007 e URIBE-VELÁSQUEZ *et al.*, 2015).

Segundo Driancourt (2001), os principais eventos dependentes de gonadotrofinas que ocorrem durante uma onda folicular são: recrutamento, etapa caracterizada pelo crescimento de um grupo de folículos; seleção, quando um folículo é definido para se tornar dominante; dominância, ocorre o crescimento final e maturação do folículo pré-ovulatório, atresia dos folículos subordinados e ovulação (Figura 1).

Porém, foi verificado por Ginther e Kot (1994), que a dominância folicular em caprinos foi evidente apenas na primeira e na quarta onda folicular no ciclo estral. Nos caprinos, em 75% das vezes é verificada a codominância, onde o segundo folículo ovulatório surge concomitantemente com o primeiro na maioria dos ciclos estrais, fomentando a ideia que o aumento na taxa de ovulação está relacionado a uma menor incidência de atresia folicular e um longo período de recrutamento do folículo ovulatório (CUETO *et al.*, 2006).

**Figura 1.** Principais eventos que ocorrem durante uma onda folicular ovulatória: recrutamento, seleção, dominância e ovulação



Fonte: Adaptado de Driancourt (2001).

O processo dinâmico da onda folicular inicia com recrutamento em média de seis folículos pequenos (2-3mm) (URIBE-VELÁSQUEZ *et al.*, 2015), sendo o FSH produzido pela hipófise, o responsável por estimular o crescimento folicular; a síntese de estradiol, inibina e fator de crescimento

semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), pelas células da granulosa (DRIANCOURT, 2001). Além de estimular a expressão de receptores do fator de crescimento epidermal (REGF) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Desse grupo de folículos recrutados, apenas dois ou três atingem 4mm, esses são selecionados para entrar na fase de dominância, os folículos dominantes desempenham um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados, levando a atresia pela secreção de inibina e por meio da produção do estradiol que desencadeia uma retroalimentação negativa sobre a hipófise, com diminuição dos níveis de FSH e liberação pulsátil do LH que atua diretamente no crescimento do folículo dominante e maturação do oócito, até atingirem o estágio pré-ovulatório (6-9mm) e a ovulação (FAFET *et al.*, 2011).

Além dos estudos de ciclo estral, a ultrassonografia foi amplamente utilizada para avaliação da eficiência dos protocolos hormonais (SIMÕES *et al.*, 2005), morfologia luteal (ARASHIRO *et al.*, 2010), efeito do análogo cloprostenol na característica morfológica do corpo lúteo e folicular (VÁZQUEZ *et al.*, 2010), protocolo de sincronização de estro e ovulação (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2004; URIBE-VELÁSQUEZ *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2011b), resposta superovulatória de doadoras de embriões (TEXEIRA *et al.*, 2008) e protocolos de estimulação ovariana (SOUZA *et al.*, 2011a)

O estudo do padrão de desenvolvimento da população folicular durante a etapa de estimulação ovariana é de fundamental importância, uma vez que o tamanho folicular está diretamente relacionado com o diâmetro do oócito e com a sua competência no desenvolvimento embrionário (ROMAGUERA *et al.*, 2010). Segundo Romaguera *et al.* (2011), quando os oócitos são recuperados de cabras adultas ou pré-púberes a partir de folículos  $\geq 3$ mm, apresentam capacidade semelhante para o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.

## 2.2 Estimulação hormonal ovariana para aspiração folicular em caprinos

Independente do estado fisiológico em que as fêmeas dos animais de produção se encontram, os ovários contêm um grande número de folículos primordiais, uma população limitada de folículos pré-antrais e antrais (DRIANCOURT, 2001). Dessa população, um pequeno número de folículos chega à ovulação, estima-se que 99,9% sofrem atresia folicular, fazendo com que o ovário seja um órgão com baixo aproveitamento de gametas (JOHNSON, 2003).

Uma forma de aproveitar esse potencial baseia-se na aspiração folicular *in vivo*, com a utilização da LOPU na obtenção de oócitos imaturos que serão utilizados na PIV (BALDASSARRE *et al.*, 2002). Com esse objetivo, as doadoras são previamente submetidas à estimulação hormonal a fim de maximizar o número de oócitos/doadora/sessão (FREITAS *et al.*, 2007) e a qualidade dos oócitos recuperados (BALDASSARRE, 2012).

Os protocolos de estimulação ovariana promovem o crescimento folicular, sendo indicado para fêmeas pré-púberes, em anestro estacional ou geneticamente superiores (BERNARDI, 2005). Segundo Baldassarre (2012), recupera-se em média 10 COCs/doadora/sessão em cabras estimuladas. Quando não estimuladas, obtém-se de três a quatro COCs/doadora (COGNIÉ, 1999).

O protocolo tradicional de estimulação ovariana em caprinos é baseado na sincronização de estro por meio de dispositivos intravaginais impregnados com progestágenos, durante um período de nove a 11 dias, associado ao tratamento com gonadotrofinas e uma dose do análogo da  $PGF_{2\alpha}$ , 36 horas antes do momento da LOPU (BALDASSARRE, 2012), com retirada dos implantes antes da realização da LOPU (SOUZA-FABJAN *et al.*, 2013; SOUZA-FABJAN *et al.*, 2014b).

A utilização de protocolos longos, por um período de 10 a 11 dias (BALDASSARRE *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2011a; AVELAR *et al.*, 2012; SOUZA-FABJAN *et al.*, 2013; SANCHEZ *et al.*, 2014), promove o aumento na concentração sérica do progestágenos, que atua na inibição da secreção

endógena de LH, promovendo a regressão de folículo dominante por atresia e o surgimento da emergência de uma nova onda folicular (SOUZA-FABJAN *et al.*, 2014a). No entanto, Rubianes e Menchaca (2003) avaliaram a capacidade dos implantes com progestágenos em manter os níveis de progesterona adequados e verificaram que após seis dias da inserção do implante, a concentração sérica de progesterona diminuiu para níveis subluteais (<2ng/mL), mantendo esse nível até a retirada do dispositivo, favorecendo desta forma, a persistência e o crescimento excessivo do folículo dominante.

Já os protocolos curtos com duração de cinco dias, garantem níveis séricos de progesterona adequados até o final do protocolo, atua na inibição da liberação pulsátil do LH e conseqüentemente da ovulação, sendo que um grupo de novos folículos estará presente nos ovários ao final do protocolo (RUBIANES e MENCHACA, 2003). A utilização de protocolo curto de estimulação ovariana em ovelhas adultas (TEIXEIRA *et al.*, 2011) e pré-púberes (TEIXEIRA *et al.*, 2015) apresentaram resultados satisfatórios, porém até o presente momento não foi relatado para a espécie caprina.

Além dos tipos de fontes de progestágenos e duração do protocolo, diferentes doses, associações e números de aplicações FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) estão sendo testados para se obter aumento no número de folículos capaz de produzir oócitos viáveis. A resposta ovariana a essas gonadotrofinas depende do número de folículos sensíveis ao hormônio no momento do protocolo, para melhorar a eficácia da estimulação (DRIANCOURT, 2001). Segundo Haldar e Ghosh (2015), os principais folículos antrais sensíveis ao recrutamento pelo FSH são de 2 a 3mm de diâmetro.

Os primeiros protocolos de estimulação ovariana em caprinos foram descritos por Graff *et al.* (1999), com utilização de implantes subcutâneos auriculares com norgestomet por 11 dias, associado a uma dose de 25mg de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e quatro doses decrescentes de FSH de origem suína (FSHp) ou equina (FSHe), na dose 20mg ou 40mg. Esses autores verificaram melhores resultados com 40mg de FSHp, em relação ao número de oócitos recuperados de 14,8; quando comparado com a média de 8 oócitos, utilizando 20mg de FSHp e 20 ou 40mg de FSHe.

Posteriormente, Baldassarre *et al.* (2002) utilizaram esponjas intravaginais com 60mg de acetato de medroxiprogesterona durante 10 dias e aplicação de 125µg de um análogo sintético de PGF<sub>2</sub>α, no oitavo dia do protocolo e comparou a eficiência de dois tratamentos gonadotrófico, com 133mg de FSHp distribuídos em quatro doses 48 antes da LOPU, e o outro com 80mg de FSHp associado a 300UI de eCG, aplicados no mesmo momento, 36 ou 48 antes do procedimento de LOPU, não encontraram diferença no número de COCs recuperados (10,9 oócitos/doadora) e na taxa de recuperação (88,7%). O mesmo protocolo com 80mg de FSHp e 300UI de eCG, 36 horas antes na LOPU, foi utilizado por Baldassarre *et al.* (2007), para avaliarem sua eficiência em cabras com 7 a 8 anos de idade, com dificuldades adquiridas em gestarem e obtiveram uma média de 15,7±8,4 oócitos recuperados/doadora.

O tratamento gonadotrófico com 80mg de FSHp e 300UI de eCG para estimulação ovariana foi utilizado por Cordeiro *et al.* (2014), que verificaram variação na quantidade e qualidade dos oócitos recuperados em cabras adultas e pré-púberes submetidas a seis sessões de LOPU. Nas cabras adultas o número de COCs recuperados variou entre 7,8±0,83, na primeira a 3,6±0,83, na sexta sessão de aspiração e nas fêmeas pré-púberes variou entre 5,3±0,72, na primeira a 4,6±0,83, na sexta sessão de aspiração. Quanto a taxa de COCs viáveis (grau 1, 2 e 3) para PIV nas cabras adultas, variou entre as sessões com média de 7,4±0,72, na primeira e 2,6±0,72, na sexta sessão. Já nas fêmeas pré-púberes, variou entre 4,6±0,79 a 3,8±0,72, na primeira e sexta sessões de aspiração, respectivamente.

Desta forma, a variação na qualidade e quantidade dos oócitos recuperados depois de repetidas estimulações ovarianas, utilizando eCG e FSHp, pode ter sido causada devido à formação de anticorpos anti-eCG em resposta a estimulação imunológica decorrente do alto peso molecular e meia vida longa do fármaco em aplicações repetidas, enquanto que o FSH apresenta uma resposta imunológica menor (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A baixa produção dos anticorpos anti-FSH pode ser devido o rápido metabolismo do FSHp em cabras, estimado em 5h após sua administração intramuscular (HOLTZ, 2005).

Segundo Freitas *et al.* (2007), independente do tratamento gonadotrófico, o intervalo entre a estimulação ovariana e a aspiração folicular

apresenta melhor resultado quando os folículos são aspirados 36-48h após a injeção de gonadotrofina. No entanto, Abdullah *et al.* (2008) utilizaram implante intravaginal de liberação lenta (CIDR®) durante 10 dias, associado a uma dose de 125µg do análogo da PGF<sub>2</sub>α e tratamento gonadotrófico com 70mg de FSH associado a 500UI de hCG, para avaliarem o intervalo entre estimulação ovariana e o momento da realização da LOPU em caprinos e observaram que quando a LOPU foi realizada 60 e 72 horas após a estimulação ovariana, os resultados foram superiores para quantidade de oócitos recuperados com grau I e para taxa de recuperação, quando comparado a 36 horas.

Almeida *et al.* (2010) avaliaram a taxa de maturação e expressão do REGF nas células do *cumulus* antes e após maturação dos oócitos recuperados de cabras submetidas ao protocolo longo (11dias) e estimulação ovariana a base do FSHp, sendo um grupo com cinco doses decrescente de FSH ((30/30, 20/20 e 20mg), a cada 12h e outro com três doses decrescentes de FSH (60, 40 e 20mg), a cada 24h. O tratamento com cinco doses de FSH apresentou melhor expressão de REGF no cumulus dos oócitos recuperados, que parece estar associado a retomada da meiose. Após a maturação *in vitro* (MIV), verificaram uma taxa superior para o tratamento com cinco doses (49,1%), quando comparado ao tratamento com três doses (31,1%).

Souza *et al.* (2011a) e Avelar *et al.* (2012) compararam a eficiência dos dois protocolos com FSHp propostos por Almeida *et al.* (2010) ao tratamento gonadotrófico com 70mg de FSH associado a 200UI de eCG aplicados no mesmo momento, 36 horas antes da LOPU, tendo como objetivo simplificar o procedimento de estimulação ovariana, sem comprometer a resposta dos animais tratados. Avelar *et al.* (2012) verificaram taxa de recuperação superior para protocolo de cinco doses de FSH (84,1%), quando comparado ao com três doses de FSH (68,2%) e o FSH e eCG (72,4%). Em relação a taxa de maturação oocitária, foi inferior no grupo com três doses (32,1%; 27/84), quando comparado ao grupo com cinco doses (49,1%; 53/108) e com FSH e a eCG (46,2%; 42/91).

Souza-Fabjan *et al.* (2013) avaliaram o protocolo com FSHp e eCG, proposto anteriormente por Souza *et al.* (2011a) e Avelar *et al.* (2012), para obtenção de oócitos para PIV e obtiveram 9,1 oócitos recuperados por doadora, taxa de recuperação de 74,3%, com um total de 153 oócitos

encaminhados para PIV, obtendo uma taxa de formação de blastocistos de 51%.

Sanchez *et al.* (2014) propuseram um protocolo de estimulação ovariana em cabras com uma dose total maior de FSHp de 180mg (45/45, 30/30 e 30 mg) distribuída em cinco doses, 24 horas antes do momento da LOPU. Após sete sessões de aspiração folicular consecutivas, não foi observado diferença entre as sessões para número de COCs recuperados ( $13,37 \pm 1,8$ ) e uma taxa de recuperação de 71,8%.

Os protocolos de estimulação folicular ovariana em caprino utilizam um conjunto de hormônios com o objetivo de obter o maior número de COCs competentes por doadora para MIV. A competência oocitária é adquirida durante a fase de crescimento, quando ocorre a síntese e armazenamento de proteínas e RNAs, o que implica na habilidade não somente para a maturação nuclear, mas também em mudanças citoplasmáticas (ANGUITA *et al.*, 2007).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

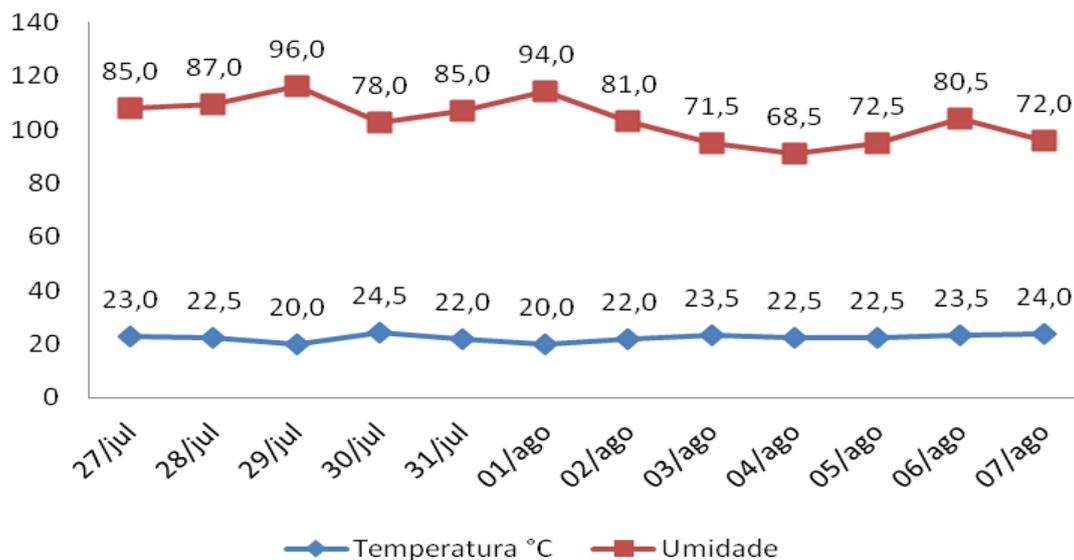
O estudo foi conduzido em duas etapas experimentais, na Fazenda Sítio da Pedra, situada no município de Itaberaba, Bahia, localizada a 12°31'39"S de Latitude, 40°18'25"W de Longitude, com temperatura média anual de 16,66°C, umidade relativa do ar de 64,83% e pluviosidade média anual de 420,27mm (INMET, 2015a). Apresenta clima seco, pela tipologia climática koppen (SEI, 1997).

Os procedimentos referentes à manipulação dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRB, processo número 23007.003377/2015-41.

#### **3.1 Etapa Experimental I**

Foi realizada no período de 27 de julho a sete de agosto de 2015, apresentando nesse período temperatura média de  $22,5 \pm 3,6^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $80,9 \pm 18,5\%$  (Figura 2) (INMET, 2015b).

**Figura 2.** Temperatura média e umidade relativa do ar durante a Etapa Experimental I



Foram utilizadas 24 cabras SRD, com idade média de  $3,0 \pm 0,6$  anos, pluríparas, com 60 dias pós-parto e submetidas ao regime de amamentação controlada e com média de escore de condição corporal (ECC) de  $2,5 \pm 0,3$ , segundo Morand-Fehr e Hervieu (1999). Previamente selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, com auxílio de ultrassonografia por via transretal (Pie Medical®, modelo ÀquilaVet, transdutor linear de 6MHz).

As fêmeas foram mantidas em regime semi-intensivo de criação, em pasto de gramínea buffel (*Cenchrus Ciliaris L.*) e suplementação com milho inteiro (200g/animal), sal mineral (Caprinofós®, Tortuga) e água *ad libitum*.

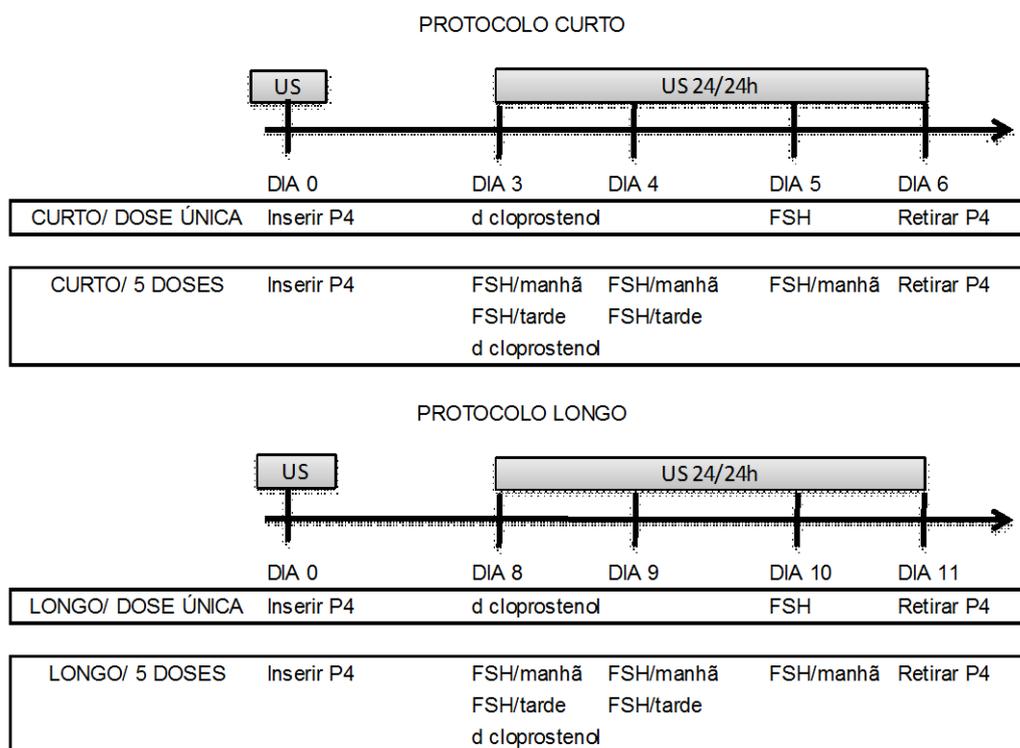
Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x2, variando duração do protocolo hormonal em curto e longo (sete e doze dias, respectivamente) e número de aplicações de FSH em única ou múltiplas doses (uma e cinco doses, respectivamente), totalizando quatro tratamentos, com seis repetições.

Todas as cabras receberam esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon®, Syntex S.A, Argentina), acrescidas de 10mg de oxitetraciclina (Tormicina LA®, Tortuga), por um período de sete (protocolo curto) ou doze dias (protocolo longo), dependendo do tratamento experimental, associado a uma dose de 125µg de

um análogo sintético de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Cloprostenol Sódico Sincrocio®, Ourofino, Brasil), aplicado 72 horas antes da retirada das esponjas.

As aplicações de FSH nos protocolos longo e curto foram realizadas conforme a Figura 3. A dose de FSH NIH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá) utilizada foi de 120mg, aplicada em dose única ou em cinco doses de 30/30, 20/20 e 20mg, em intervalos de 12h, por via intramuscular (IM).

**Figura 3.** Protocolos hormonais e momento das avaliações ultrassonográficas



Para acompanhamento do crescimento folicular, com determinação do número e tamanho dos folículos em: pequeno (2-3mm), médio (4-5mm) e grande ( $\geq 6$ mm), segundo CUETO *et al.* (2006), foram realizadas avaliações ultrassonográficas (Figura 3).

As avaliações ultrassonográficas dos ovários foram executadas por ultrassonografia em tempo real (UTR), pela via transretal, utilizando um ultrassom (Aloka®, Prosound 2), acoplado a um transdutor linear de 6,0 MHz.

Elas foram iniciadas sempre às 18h, com mensurações nos dias (D): D0, D3, D4, D5 e D6; nos protocolos curtos e D0, D8, D9, D10 e D11; nos

protocolos longos, sendo que D0 refere-se ao dia da inserção das esponjas intravaginais (Figura 3).

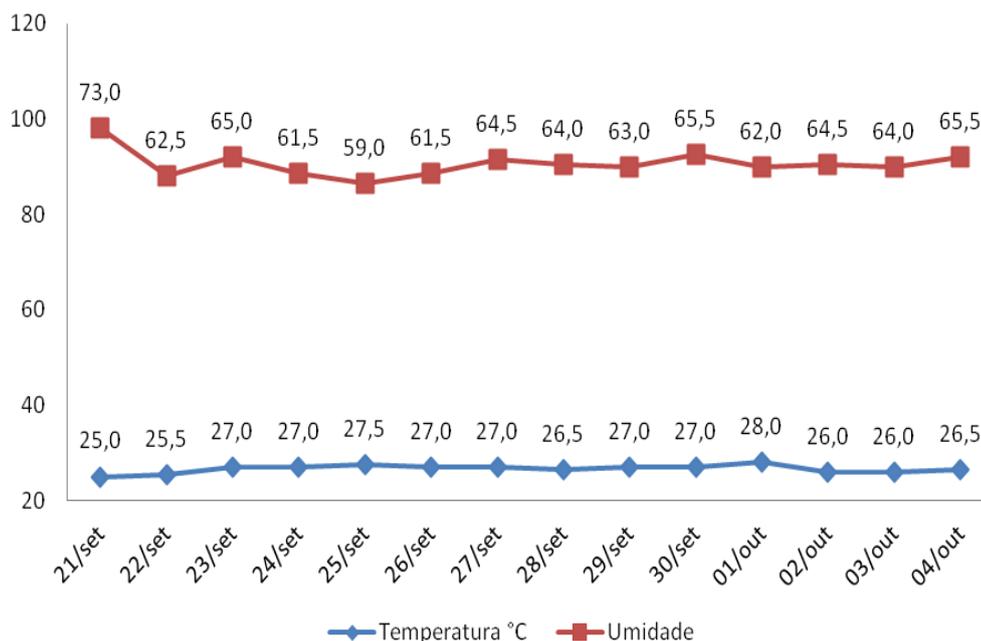
O diâmetro folicular foi obtido pela distância entre dois pontos da cavidade antral dos folículos >2mm, segundo Uribe-Velásquez *et al.* (2015). Todos os exames ultrassonográficos foram realizados por um mesmo avaliador e os diâmetros, a posição e características das estruturas ovarianas foram anotadas e desenhadas em fichas individuais.

Para análise estatística dos dados de número dos folículos foi utilizado o Modelos Lineares Generalizados (GLM) para uma distribuição *Poisson* com função de ligação *log*. Para tamanho dos folículos foi utilizado o GLM para uma distribuição *Normal*, com função de ligação *identidade*. A comparação das estimativas de médias entre os fatores foi utilizado o teste de *Bonferroni*.

### **3.2 Etapa Experimental II**

A etapa experimental II foi conduzida no período de 21 de setembro a quatro de outubro de 2015, com temperatura média de  $26,6 \pm 4,1\text{C}^\circ$  e umidade relativa do ar de  $63,9 \pm 21,1\%$  (Figura 4) (INMET, 2015b).

**Figura 4.** Temperatura média e umidade relativa do ar durante a etapa experimental II



Foram utilizadas 18 cabras SRD, com idade média de  $2,4 \pm 0,7$  anos, pluríparas, solteiras e com ECC médio de  $2,6 \pm 0,6$ ; segundo Morand-Fehr e Hervieu (1999). Previamente selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, com auxílio de ultrassonografia por via transretal (Pie Medical®, modelo ÀquilaVet, transdutor linear de 6MHz), mantidas em regime semi-intensivo de criação, em pasto de gramínea buffel (*Cenchrus Ciliaris L.*) e suplementação com milho inteiro (200g/animal), sal mineral (Caprinofós®, Tortuga) e água *ad libitum*.

As cabras foram às mesmas utilizadas na etapa experimental I, porém foram redistribuídas nos tratamentos experimentais. O esquema fatorial 2x2, com cinco repetições para tratamentos com protocolo curto e quatro repetições para tratamentos com protocolo longo e os protocolos experimentais foram realizados conforme a etapa experimental I (Figura 3).

Os procedimentos de LOPU foram realizados pelo mesmo técnico, em grupos de três ou quatro animais por dia. Após jejum hídrico de 24 horas e alimentar de 36 horas, os animais foram submetidos à anestesia epidural e em seguida anestesia dissociativa. Para a epidural alta (última vertebra lombar e a primeira sacral) foi utilizado cloridrato de lidocaína com vasoconstritor

(Anestésico L Pearson®, Euroframa, Brasil) na dose de 1mL/4,5kg de peso vivo, com utilização máxima de 10mL/animal. Para anestesia dissociativa, foi feita administração lenta por via intravenosa de solução de 0,8mg/mL de cloridrato de xilazina (Anasedan®, Ceva, Brasil), associada a 10mg/mL de cloridrato de ketamina (Dopalen®, Ceva, Brasil). Desta solução foi administrada a dose de 1mL/10Kg de peso vivo. A manutenção da anestesia foi realizada com repiques de 0,5mL/10Kg de peso vivo, sempre que necessário até o final do procedimento de aspiração.

Após a indução anestésica, os animais foram contidos em maca e tricotomizados na região cranial ao úbere, em seguida realizou-se a antisepsia local (PVPI degermante 10% e álcool 70%) e a anestesia local infiltrativa com 1,0mL de cloridrato de lidocaína nos botões de acesso laparoscópicos, sendo 0,5mL no tecido subcutâneo e 0,5mL intramuscular.

Depois de anestesiadas, as fêmeas foram posicionadas em decúbito dorsal com posterior inclinação em 45° (*Trendelenburg*), com o auxílio de um bisturi procedeu-se a incisão cutânea (12mm), de 10 a 12cm cranial ao úbere, e 5cm à direita da linha média, para facilitar a introdução do trocarte de 11mm (Endopath xcel®, Bladeless, Ethicon), com válvulas para insuflação conectado um sistema com filtro acoplado ao inalador de ar comprimido (Inalar Compact®, NS), para estabelecer o pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>. Por este trocarte foi introduzido a óptica do endoscópio (Endoview®) conectado a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o interior da cavidade, sendo a imagem visualizada diretamente na óptica, em seguida foi introduzido o segundo trocarte 11mm, em posição antimérica ao primeiro e o terceiro trocarte de 11mm, 15 a 20cm cranial ao úbere na linha média.

Pelo segundo trocarte, foi introduzido a pinça de apreensão de 5mm (Endo Clinch II®, Covidien), que permitiu a manipulação do útero, tubas e ovários. Após visualização e individualização destes, cada ovário foi fixado com a pinça pelo mesovário. Previamente à punção folicular de cada ovário, estes foram examinados e todos os folículos visíveis na superfície do ovário foram contados.

Para realização das punções, utilizou-se um sistema de aspiração® (WTA) com lúmen simples, composto por uma rolha de silicone, a qual foi acoplada ao tubo de colheita (50mL) e uma linha de aspiração foi cortada com

60cm de comprimento, conectado a uma agulha própria para aspiração de 20G (Agulha para aspiração folicular em ovinos®, WTA) e acoplada à haste para pequenos ruminantes (Haste para aspiração folicular®, WTA). O fluxo de aspiração foi produzido por um aspirador cirúrgico (Aspiramax®, modelo MA 520, NS) conectado a rolha do sistema de aspiração por um circuito de silicone (Filtro para bomba de vácuo®, WTA), sendo o fluxo previamente regulado para 15mL/min.

No início do procedimento de aspiração dos CCOs, procedeu-se a lavagem interna da linha de aspiração com o meio de colheita DMPBS (DMPBS-FLUSH®, Nutricell, Brasil), acrescido 25UI/mL de heparina sódica (Hepamax-S®, Blausiegel), aquecido a 37C°, deixando 2,0mL deste meio para receber os oócitos, mesmo procedimento foi realizado após as aspirações foliculares de cada ovário, para evitar aderência dos COCs no lúmen da linha de aspiração.

Em seguida, foi introduzida a haste de aspiração conectada a uma agulha na cavidade pelo terceiro trocarte. A punção foi realizada movimentando os ovários em diferentes posições com auxílio da pinça de apreensão. A agulha foi inicialmente colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permitiu as perfurações dos folículos nas suas extremidades. Uma vez inserida no folículo, a haste foi cuidadosamente rotacionada em 90°, no sentido horário e anti-horário, para garantir que todo o conteúdo folicular fosse aspirado.

Ao término das aspirações os ovários foram lavados com aproximadamente 120mL de solução fisiológica 0,9%, acrescido de heparina sódica (5UI/mL), aquecido a 37C° para remoção de coágulos da superfície, minimizando a formação de aderências. As dermorráfias foram realizadas com pontos tipo Wolf, com fios de sutura mononylon 0-0. Após a sutura, procedeu-se à limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica, aplicação de spray repelente e cicatrizante (Topline®, Merial) ao redor da ferida cirúrgica e antibioticoterapia com aplicação IM de oxitetraciclina (Tormicina LA®, Tortuga) na dose de 20mg/Kg. Os animais foram retirados da maca de contenção e observados até o completo restabelecimento do procedimento anestésico. Os pontos foram retirados sete dias após a LOPU.

Logo após o término do procedimento de aspiração folicular de cada animal, o tubo de coleta com fluido folicular e COCs, foi encaminhado para

etapa de rastreamento e classificação. Todos os materiais e soluções utilizados foram mantidos a 37C<sup>o</sup>, o procedimento foi realizado pelo mesmo técnico. Todo o conteúdo do tubo de coleta foi colocado no filtro (Filtro coletor para FIV<sup>®</sup>, WTA) realizando duas lavagens com 10mL de DMPBS Flush acrescido com heparina sódica (25UI/mL). Após o procedimento, o conteúdo foi depositado em placa de Petri descartável (100x20mm, Corning<sup>®</sup>) para o rastreamento dos COCs com auxílio de estereomicroscópio em aumento de 40x. Os COCs foram colocados em placa pequena (35x10mm, Corning<sup>®</sup>) e classificados levando em consideração as células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma, segundo Freitas e Melo (2010) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Critérios de classificação de complexos *cumulus* oócito (COC) recuperados a partir de cabras criadas no Nordeste do Brasil

<b>Característica</b>	<b>Grau</b>
Cumulus compacto com múltiplas camadas e citoplasma do oócito finamente granulado	1
Uma a três camadas de células do cumulus e citoplasma do oócito finamente granulado	2
Cumulus incompleto ou nenhuma célula ou citoplasma do oócito heterogêneo	3
Oócito com forma anormal e citoplasma do oócito heterogênea ou oócito apoptótico e células do investimento cumulus-corona gelatinosa	4

Fonte: Freitas e Melo (2010).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de folículos visualizados e aspirados (2 a 7mm); número de COCs recuperados; taxa de recuperação; classificação morfológica dos COCs recuperados (Grau 1, 2, 3 e 4) e a taxa de COCs viáveis para PIV (número de COCs de grau 1, 2 e 3 em relação ao total recuperado).

Para análise estatística dos dados, foi verificado a normalidade dos dados, pelo teste de Shapiro Wilk. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados por ANOVA com 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Etapa Experimental I

Não houve efeito dos fatores e na interação ( $P>0,05$ ) dentro da mesma categoria para número de folículos grandes, médios e pequenos visualizados no momento da inserção das esponjas (D0) (Tabela 2). Porém, houve diferença ( $P<0,05$ ) para número de folículos entre as categorias no momento do início dos protocolos hormonais (D0), com menor número de folículos pequenos ( $0,54\pm 0,30$ ), quando comparado aos folículos médios ( $2,83\pm 0,67$ ) e grandes ( $2,00\pm 0,56$ ) (Tabela 2). Cueto *et al.* (2006) verificaram variação no número de folículos nas categorias durante os dias do ciclo estral, sendo que durante a fase folicular, próximo à ovulação, houve uma redução do número de folículos pequenos (2-3mm), enquanto o número de folículos grande ( $\geq 6$ mm) aumentou.

**Tabela 2.** Número de folículos ovariano pequenos, médios e grandes de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante visualizados por ultrassonografia

Números de folículos por categoria				
Momento avaliação	n	Pequeno (2-3mm)	Médio (4-5mm)	Grande ( $\geq 6$ mm)
D0	24	$0,54\pm 0,30$ b	$2,83\pm 0,67$ a	$2,00\pm 0,56$ a
D3/D8	24	$1,25\pm 0,45$ b	$3,50\pm 0,75$ a	$2,04\pm 0,56$ b

Dados não paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) analisados por Modelos Lineares Generalizados (GLM). Não houve efeito principal e nem interação ( $P>0,05$ ) nos parâmetros avaliados. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ) no número de folículos entre as categorias. Dia de início dos protocolos hormonais (D0). Dia da aplicação do análogo PGF<sub>2</sub> $\alpha$  no protocolo e aplicação da primeira dose de FSH do tratamento com 5 doses (D3/D8). Número de animais experimentais por tratamento (n).

Na segunda avaliação ultrassonografia (D3 protocolo curto e D8 protocolo longo), realizada no momento da aplicação do análogo da  $PGF_{2\alpha}$  e aplicação da primeira dose de FSH nos tratamentos com múltiplas doses, com os folículos ovarianos sob ação da progesterona exógena, verificou-se diferença ( $P < 0,05$ ) para número de folículos por categorias, com maior número de folículos médios (4-5mm) ( $3,50 \pm 0,75$ ) (Tabela 2).

O maior número de folículos na categoria médio no presente estudo pode ter sido causado pela atuação do implante de progesterona, como verificado por Uribe-velásquez *et al.* (2008) onde avaliaram o efeito da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas, verificando o aumento na concentração plasmática da progesterona, diminuição na frequência pulsátil de LH, alteração no padrão de crescimento do folículo dominante, apresentando o diâmetro máximo do  $4,0 \pm 0,47$ mm, quando comparado ao grupo controle, sem progesterona exógena, com diâmetro de  $5,5 \pm 0,52$ mm.

Para número de folículos grandes, médios e pequenos visualizados por ultrassonografia no momento da LOPU (D6 protocolo curto/D11 protocolo longo), houve efeito dos fatores ( $P < 0,05$ ) e não houve efeito de interação ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

Para número de folículos pequenos houve efeito ( $P < 0,05$ ) do fator duração do protocolo hormonal, com uma média de  $1,05 \pm 0,62$  folículos para o protocolo curto e ausência de folículos pequenos no longo (Tabela 3). A ausência de folículos pequenos no tratamento com protocolo longo, justifica-se provavelmente pela ação do folículo dominante formado decorrente dos níveis subluteais encontrados nesses tipos de protocolos (RUBIANES e MENCHACA, 2003). Medan *et al.* (2003) verificaram que na presença de um grande folículo antral obtiveram uma concentração sérica da inibina alta, com correlação negativa com as concentrações de FSH, que promovem a atresia dos folículos subordinados.

**Tabela 3.** Número de folículos ovariano pequenos, médios e grandes visualizados por ultrassonografia no momento da LOPU de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante

<b>Número de folículos por categoria</b>					
<b>Momento avaliação</b>	<b>Fatores</b>	<b>n</b>	<b>Pequeno (2-3mm)</b>	<b>Médio (4-5mm)</b>	<b>Grande (≥6mm)</b>
D6/D11 (LOPU)	CURTO	1	1,05±0,62a	5,44±1,35	6,69±1,50
	LONGO	2			
	LONGO	12	0,00±0,00b	5,27±1,32	5,95±1,40
	DOSE ÚNICA	12	0,47±0,58	6,49±1,45a	5,00±1,27b
	5 DOSES	12	0,00±0,00	4,42±1,20b	7,97±1,61a

Dados não paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) avaliados por Modelos Lineares Generalizados (GLM). Houve efeito dos fatores ( $P<0,05$ ) e não houve interação ( $P>0,05$ ) nos parâmetros avaliados. Dia da LOPU (D6/D11). Número de animais experimentais por tratamento (n).

Já para o número de folículos nas categorias médio e grande houve efeito ( $P<0,05$ ) do fator número de doses (Tabela 3). Para número de folículos médios, o fator dose única apresentou o maior número de folículos (6,49±1,45) quando comparado ao fator doses múltiplas (4,42±1,20). O maior número de folículos nesta categoria pode ter sido causado pela estimulação do crescimento dos folículos pequenos presentes no ovário, no momento da dose única de FSH, aplicada 36 horas antes da LOPU. Este resultado corrobora com Rubianes e Menchaca (2003), que observaram que na ausência do folículo dominante o FSH exógeno promoveu um aumento na população de folículos pequenos (3 a <4mm), que culminou no aumento da população de folículos médios (4 a <5mm), 36 horas após a aplicação hormonal.

O número de folículos grandes no fator doses múltiplas (7,97±1,61) apresentou uma média superior ao fator dose única (5,00±1,27) ( $P<0,05$ ) (Tabela 3). Nos tratamentos com cinco doses, as aplicações são iniciadas 72 horas antes do momento da LOPU, possibilitando sua atuação sobre os folículos presentes no início da estimulação ovariana. Estimular proliferação

celular e conseqüentemente o crescimento do folículo antral são algumas das principais funções do FSH (SARAIVA *et al.*, 2010).

Souza *et al.* (2011a) avaliaram o número de folículos por ultrassonografia no momento da LOPU de cabras submetidas ao protocolo longo (11dias), associado a três protocolos de estimulação (cinco doses decrescente de FSHp (30/30, 20/20 e 20mg) a cada 12h, três doses decrescentes de FSHp (60, 40 e 20mg) a cada 24h e 70mg de FSHp associado a 200UI de eCG e) e não observaram diferença entre os tratamentos, com média de 5,98 para pequenos folículos (<3mm); 7,76 para folículos médios (3 a 4mm) e 3,41 para folículos grandes (>4mm), com um total de folículos presentes nos ovários, superior ao encontrado no presente estudo.

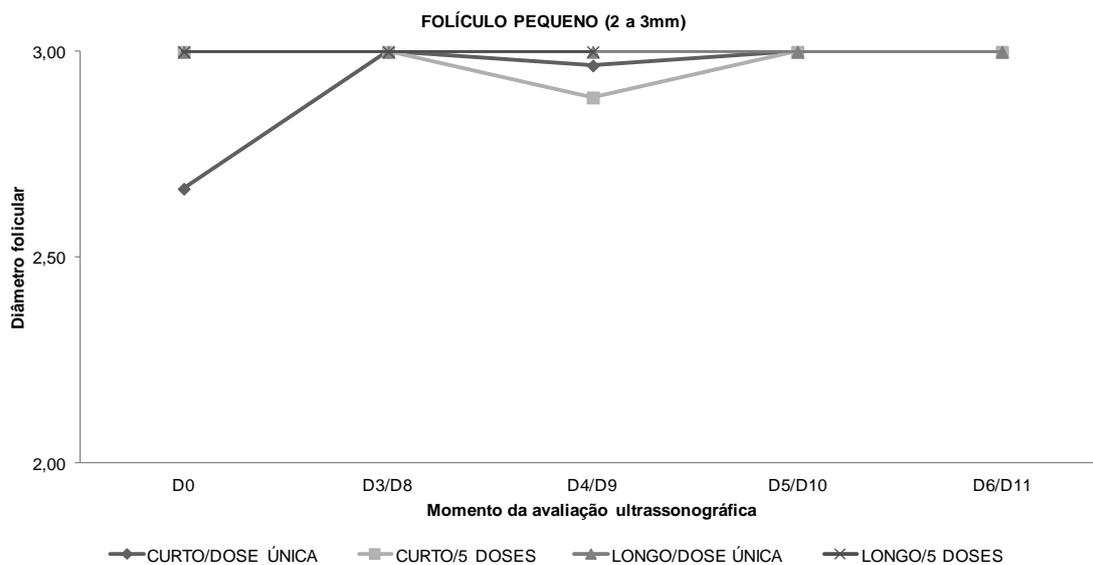
Os protocolos de estimulação ovariana objetivam aumentar o número de folículos para aspiração e recuperação de COCs viáveis para PIV. Mossa *et al.* (2008) avaliaram a correlação entre o número de folículos ovarianos presente no ovário e o potencial de desenvolvimento *in vitro* dos embriões em ovinos. Os ovários foram classificados quanto ao número de folículos em baixo ( $\leq 4$  folículos), intermediário (5 a 7 folículos) e alto ( $\geq 8$  folículos) e verificaram maior competência para o desenvolvimento de oócitos coletados de ovários com número de folículos  $\geq 8$ , com diferença na taxa de clivagem e no total de blastocisto produzidos.

A UTR foi uma técnica eficiente na detecção dos ovários com uma taxa de 97,92%, no presente estudo. Nociti (2014) avaliou a resposta da aspiração folicular de cabras suplementadas com diferentes fontes de gorduras, observaram que é possível examinar a condição folicular presente nos ovários por ultrassonografia momentos antes da LOPU e avaliar a resposta folicular e prever o número de folículos disponíveis para aspiração, verificou ainda que os folículos considerados aspiráveis pelo ultrassom apresentaram correlação positiva com folículos aspirados ( $r=0,70$ ) e com os COCs recuperados ( $r=0,60$ ).

Durante os protocolos de estimulação ovariana, não houve efeito dos fatores e na interação ( $P>0,05$ ) para o diâmetro dos folículos pequenos (2 a 3mm) (Figura 5). Os COCs recuperados de folículos pequeno (2 a 3mm) apresentam taxa de oócitos viáveis inferior (64%) quando comparada a categoria de folículos médios (3,1 a 5,0mm), com 84% e grandes (>5mm), de 87% (CROZET *et al.*, 1995). Esses resultados corroboram com Nociti (2014),

que verificou quando os COCs são recuperados de folículos pequenos ( $\leq 3\text{mm}$ ), apresenta correlação negativa ( $r=-0,27$ ) com os COCs classificados com grau I e uma correlação positiva com grau III ( $r=0,48$ ).

**Figura 5.** Diâmetro dos folículos pequenos visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante



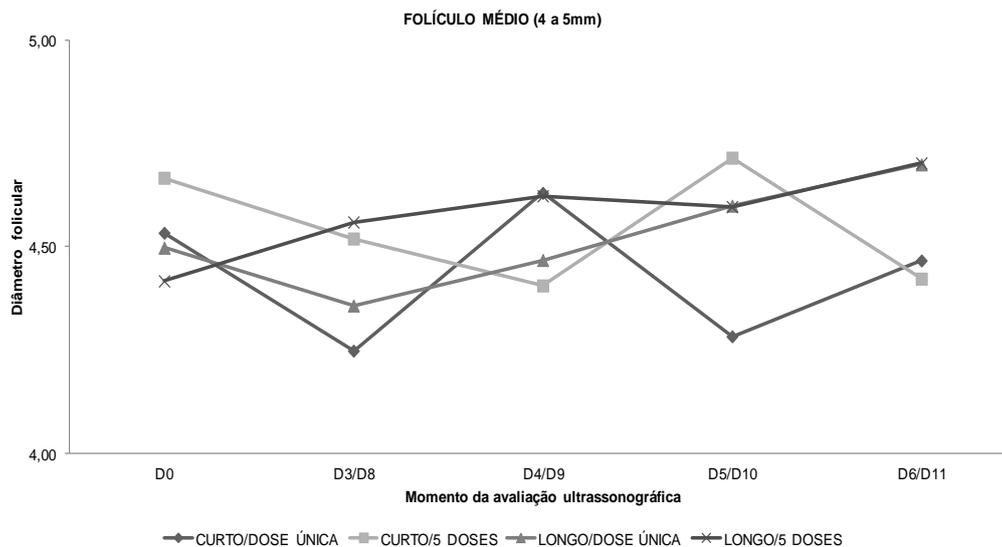
Dados paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) avaliados por Modelos Lineares Generalizados (GLM). Não houve efeito principal e nem interação ( $P>0,05$ ) no parâmetro avaliado. Início dos protocolos hormonais (D0). Dia aplicação da PGF2 $\alpha$  dos protocolos hormonais e aplicação da primeira dose dos tratamentos 5 DOSES (D3/D8). Dia quarta dose dos tratamentos 5 DOSES (D4/D9). Dia quinta dose dos tratamentos 5 DOSES e a dose do FSH dos tratamentos DOSE ÚNICA (D5/D10). Dia da LOPU (D6/D11).

Durante os protocolos de estimulação ovariana, não houve efeito dos fatores e na interação ( $P>0,05$ ) para o diâmetro dos folículos médios (4 a 5mm) (Figura 6). Os protocolos objetivam a recuperação do maior número de COCs competentes ao processo da PIV. Na categoria dos folículos médios encontra-se um grupo de folículos em crescimento, os folículos em crescimento e/ou dominantes apresentam oócitos que permanecem bloqueados no estágio de diplóteno da prófase meiótica (VAN DER HURK e ZHAO, 2003). A competência oocitária é adquirida nesta fase, devido o acúmulo de muitos RNAs mensageiros que irão atuar no desenvolvimento embrionário (ANGUITA *et al.*,

2007). No presente estudo, o maior número nesta categoria foi visualizado nos protocolos de dose única de FSH.

Nociti (2014) verificou correlação positiva entre folículo médio (3,1 a 5,9mm) visualizado por ultrassonografia e o número de folículos aspirados ( $r=0,59$ ) e COCs recuperados ( $r=0,56$ ). Crozet *et al.* (1995) verificaram uma taxa de maturação superior quando os folículos foram recuperados de folículos médios (3,1 a 5,0mm) com 83%, e grandes (>5mm), de 97%, quando comparado ao pequeno (2 a 3mm) com 70%.

**Figura 6.** Diâmetro dos folículos médios visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante

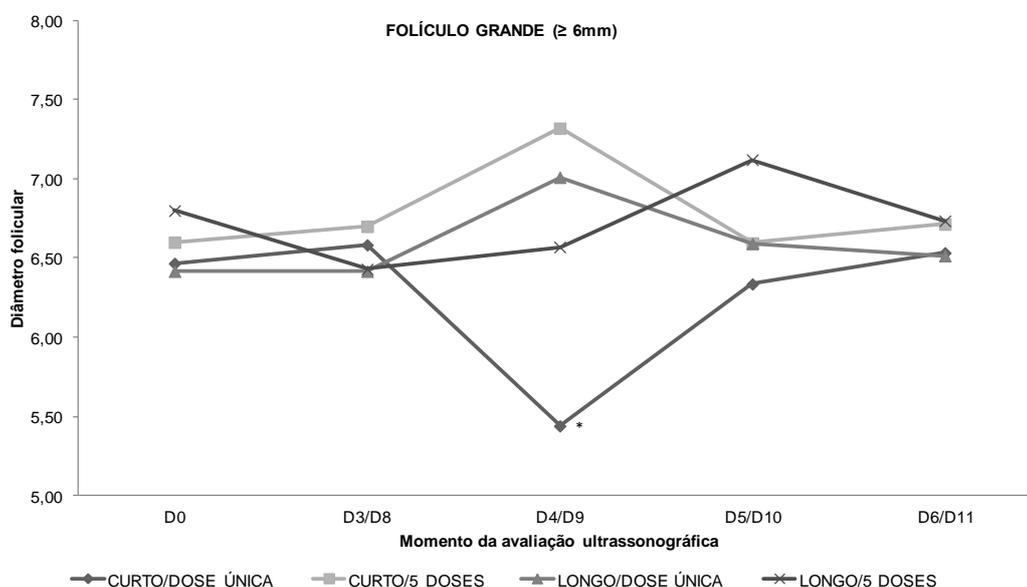


Dados paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) analisados por Modelos Lineares Generalizados (GLM). Não houve efeito principal e nem interação ( $P>0,05$ ) no parâmetro avaliado. Início dos protocolos hormonais (D0). Dia aplicação da PGF2 $\alpha$  dos protocolos hormonais e aplicação da primeira dose dos tratamentos 5 DOSES (D3/D8). Dia quarta dose dos tratamentos 5 DOSES (D4/D9). Dia quinta dose dos tratamentos 5 DOSES e a dose do FSH dos tratamentos DOSE ÚNICA (D5/D10). Dia da LOPU (D6/D11).

Na maioria das avaliações realizadas durante os protocolos de estimulação ovariana, não houve efeito dos fatores e na interação ( $P>0,05$ ) para o diâmetro dos folículos grandes ( $\geq 6$ mm) (Figura 7), exceto para avaliação no momento da quarta dose dos tratamentos com doses múltiplas (D4

protocolo curto/D9 protocolo longo) que apresentou efeito de interação ( $P < 0,05$ ) (Figura 8). O grupo de folículos nesta categoria apresenta o diâmetro do folículo pré-ovulatório da espécie caprina (6 a 9mm) como descrito por Fatet *et al.* (2011).

**Figura 7.** Diâmetro dos folículos grandes visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante



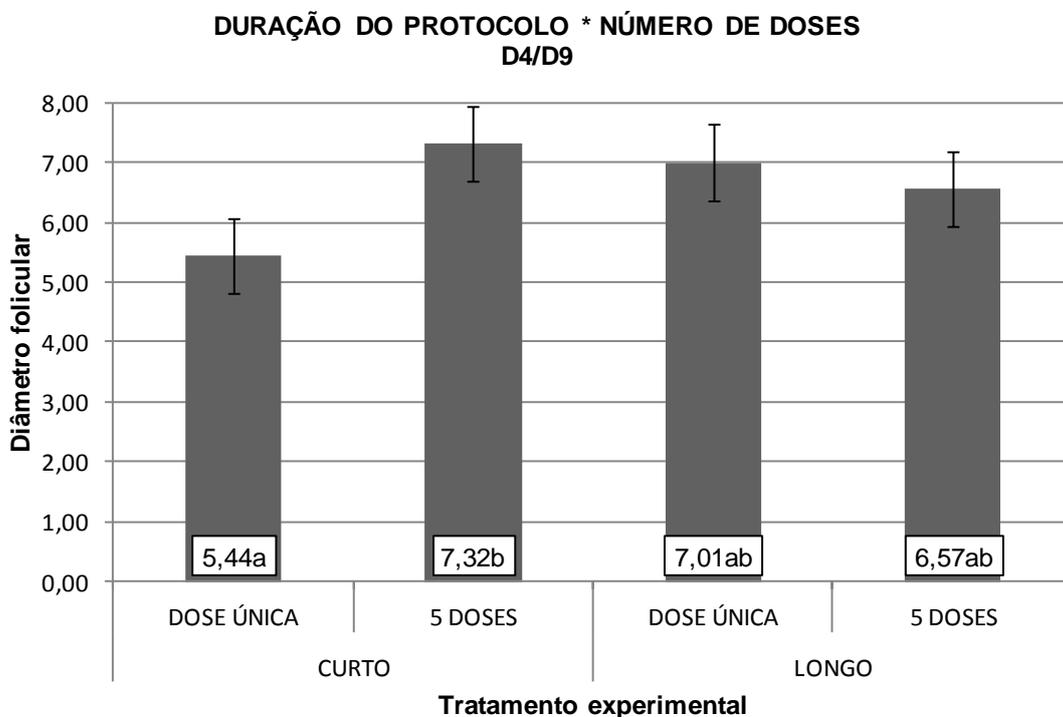
Dados paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) utilizando GLM. Não houve efeito principal ( $P > 0,05$ ), houve efeito da interação ( $P < 0,05$ ), no parâmetro avaliado. Início dos protocolos hormonais (D0). Dia aplicação da PGF2 $\alpha$  dos protocolos hormonais e aplicação da primeira dose dos tratamentos 5 DOSES (D3/D8). Dia quarta dose dos tratamentos 5 DOSES (D4/D9). Dia quinta dose dos tratamentos 5 DOSES e a dose do FSH dos tratamentos DOSE ÚNICA (D5/D10). Dia da LOPU (D6/D11).

*In vivo*, a retomada da meiose é iniciada após o pico de LH e acontece somente em oócitos de folículos pré-ovulatórios meioticamente competentes (VAN DER HURK e ZHAO, 2003). Desta forma, a aspiração de folículos grandes pode possibilitar a recuperação de oócito com a retomada do processo maturação *in vivo*. Nociti (2014) verificou correlação positiva entre folículo grande ( $\geq 6$ mm) visualizado por ultrassonografia e o número de folículos aspirados ( $r=0,53$ ), porém uma correlação fraca com os COCs recuperados ( $r=0,39$ ). Segundo Baldassarre *et al.* (1994) ao aspirar folículos  $>5$ mm de

ovelhas estimuladas com FSHp, verificaram aspecto viscoso do fluido folicular, causado pela síntese de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico pelas células do *cumulus* e ruptura do folículo com extravasamento do fluido no momento da punção, estes fatores podem justificar a baixa taxa de COCs recuperados após aspiração dos folículos grandes.

Na avaliação ultrassonográfica realizada no momento da aplicação da quarta dose do FSH nos protocolos com cinco doses (D4/D9) apresentou efeito de interação ( $P < 0,05$ ) (Figura 8). Sendo que o tratamento curto com dose única apresentou menor diâmetro (5,44), quando comparado ao curto com múltiplas doses (7,32). Porém os tratamentos longos com dose única (7,01) e com cinco doses (6,57) apresentaram médias semelhantes ao curto com dose única e ao curto dose múltipla.

**Figura 8.** Diâmetro dos folículos grandes visualizados por ultrassonografia de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação dose única ou cinco doses do hormônio folículo estimulante



Dados paramétricos (média±intervalo de confiança de Wald) analisados por Modelos Lineares Generalizados (GLM). Houve efeito da interação ( $P < 0,05$ ) para no parâmetro avaliado. Dia quarta dose dos tratamentos com S DOSES de FSH (D4/D9).

Na avaliação realizada no D4 do protocolo curto ou D9 no protocolo longo, os tratamentos com dose única os ovários não tinham sido estimulados pela atuação do FSH. Na ausência do FSH no tratamento curto com dose única, justifica o menor diâmetro folicular observado. Medan *et al.* (2003) verificaram a emergência e o crescimento de folículos de 3mm para diâmetro  $\geq 5$ mm após a secreção pulsátil do FSH.

Chaves *et al.* (2010) utilizaram ovário de cabras em fase aleatória do ciclo estral, obtidos em abatedouros para correlacionar os diâmetros dos folículos aspirados distribuídos em três categorias; categoria I (2-3mm), II (4-5mm) e a III (6mm) a qualidade morfológica dos COCs recuperados, não observaram correlação ( $r = 0,02421$ ).

## 4.2 Etapa Experimental II

Não houve efeito dos fatores e na interação ( $P > 0,05$ ) para as variáveis analisadas na etapa experimental II (Tabela 4 e 5). Para número de folículos visualizados e aspirados obteve-se uma média geral de  $16,94 \pm 8,01$  e  $12,27 \pm 5,69$ , respectivamente (Tabela 4). Os números de folículos visualizados corroboram com os achados por Avelar *et al.* (2012), quando avaliaram três protocolos de estimulação ovariana (cinco doses de FSH (30/30, 20/20 e 20mg), a cada 12h; três doses de FSH (60, 40 e 20mg), a cada 24h e 70mg de FSH associado a 200UI de eCG obtiveram uma média de  $16,96 \pm 0,15$  folículos visualizados e um maior número de folículos aspirados ( $15,13 \pm 0,49$ ).

O número de COCs recuperados ( $8,11 \pm 4,68$ ) e a taxa de recuperação (65,08%) não foram influenciados pelos protocolos de estimulação ovariana ( $P > 0,05$ ) (Tabela 4), demonstrando que os protocolos com dose única de FSH além de execução mais simples, promovem a estimulação ovariana semelhante aos protocolos tradicionais. Cordeiro *et al.* (2014) utilizaram protocolo longo e estimulação ovariana com 80mg de FSHp associado a 300UI de eCG e obtiveram resultados inferiores para média COCs recuperados ( $6,03 \pm 1,42$ ) e taxa de recuperação ( $58,01 \pm 14,82$ ). Resultados superiores foram

encontrados por Sanchez *et al.* (2014), com protocolo longo, dose total maior de FSHp de 180mg (45/45, 30/30 e 30 mg), distribuída em cinco doses e obtiveram um número de COCS recuperados ( $13,37 \pm 1,8$ ) e taxa de recuperação de 71,8%.

**Tabela 4.** Número de folículos visualizados, aspirados e COCs recuperados de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação de dose única ou de cinco doses de hormônio folículo estimulante

Tratamentos	n	Folículos		COCs	
		Visualizados	Aspirados	Recuperados	Taxa recuperação
CURTO/DOSE ÚNICA	5	17,00 $\pm$ 8,03	11,60 $\pm$ 4,27	7,20 $\pm$ 3,34	62,01%
CURTO/5 DOSES	5	18,00 $\pm$ 3,67	14,60 $\pm$ 4,56	10,40 $\pm$ 3,34	66,9%
LONGO/DOSE ÚNICA	4	12,25 $\pm$ 3,59	8,25 $\pm$ 1,70	5,25 $\pm$ 2,62	61,60%
LONGO/5 DOSES	4	20,25 $\pm$ 14,17	14,25 $\pm$ 9,60	9,25 $\pm$ 5,43	70,05%
MÉDIA GERAL		16,94 $\pm$ 8,01	12,27 $\pm$ 5,69	8,11 $\pm$ 4,68	65,08%

Dados paramétricos (média  $\pm$  desvio padrão) utilizando ANOVA. Não houve efeito dos fatores e nem interação ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros avaliados. Número de animais experimentais por tratamento (n).

A qualidade dos COCs e a taxa de COCs viáveis para a PIV não foram influenciadas pelos protocolos de estimulação ovariana ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5). Os folículos recuperados são classificados quando sua qualidade morfológica levando em consideração as características das células do *cumulus* e o citoplasma do oócito. Os COCs de grau 1, 2 e 3 são considerados de boa qualidade e encaminhados para maturação (SOUZA FABJAN *et al.*, 2013).

O número médio dos folículos classificados como grau 1, 2, 3 e 4 foram  $4,33 \pm 4,47$ ;  $2,00 \pm 1,57$ ;  $1,27 \pm 1,12$  e  $0,44 \pm 0,51$ , respectivamente. Para número de COC viáveis (7,6) verificou-se uma taxa de 92,1%, diferente do encontrado por Cordeiro *et al.* (2014) em seis sessões de aspiração, com média de oócitos viáveis de  $5,08 \pm 1,72$ . De acordo com Rodriguez *et al.* (2006), a qualidade

oocitária está diretamente relacionada à presença das células do *cumulus* e o sucesso da PIV depende de COCs competentes obtidos com a aspiração folicular.

**Tabela 5.** Qualidade dos COCs recuperados e viáveis para produção *in vitro* de embriões de cabras submetidas à estimulação ovariana utilizando protocolo curto (7 dias) ou longo (12 dias), com aplicação de dose única ou cinco doses de hormônio folículo estimulante

Tratamentos	n	Qualidade dos COCs				COCs
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Viáveis nº(%)
CURTO/DOSE ÚNICA	5	3,00±2,35	2,20±0,84	1,20±1,30	0,80±0,45	6,4(84,7)
CURTO/5 DOSES	5	5,00±6,82	3,00±2,35	2,00±1,22	0,40±0,55	10,5(95,4)
LONGO/DOSE ÚNICA	4	3,00±2,45	1,25±1,50	0,75±0,96	0,25±0,50	5,0(91,7)
LONGO/5 DOSES	4	6,50±5,07	1,25±0,50	1,00±0,82	0,25±0,50	8,8(95,8)
MÉDIA GERAL		4,33±4,47	2,00±1,57	1,27±1,12	0,44±0,51	7,6(92,1)

Dados paramétricos (média ± desvio padrão) utilizando ANOVA. Não houve efeito dos fatores e nem interação ( $P>0,05$ ) nos parâmetros avaliados. Número de animais experimentais por tratamento (n). Número (nº).

Segundo Avelar *et al.* (2012) a qualidade morfológica dos COCs foram afetados pelo protocolos de estimulação ovariana, onde observou maior porcentagem de grau IV (COCs com forma anormal e citoplasma heterogêneo ou apoptóticos e células do *cumulus* gelatinosa) e a menor taxa de maturação de 32.1% quando foi utilizado três doses de FSH (60/40/20mg), a cada 24h. Esses resultados podem ter sido gerados pela inadequada estimulação gonadotrófica devido o intervalo entre as doses, o que pode ter interferido na competência meiótica COCs recuperados.

## 5 CONCLUSÃO

Os quatro protocolos foram eficientes em estimular a resposta ovariana e a produção oocitária de cabras, contudo, seria mais indicada a utilização do protocolo curto (7 dias) e aplicação de dose única de FSH, com base no maior número de folículos médios disponíveis para aspiração, além do menor tempo e maior praticidade de execução. Porém é necessário avaliar a eficiência dos oócitos coletados, nas etapas seguintes da produção *in vitro* de embriões.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.B.; LIOW, S.L.; RAHMAN, A.N.M.A.; CHAN, W.K.; WAN-KHADIJAH, W.E.; NG, S.C. 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology** 70: 765-771.
- ALMEIDA, K. C.; PEREIRA, A. F., NETO, A. A.; AVELAR, S. R. G.; BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; MELO, L. M. 2010. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. **Zygote** 19: 127-136.
- ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. 2007. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, (CDC2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology** 67: 526-536.
- ARASHIRO, E.K.N.; VIANA, J.H.M.; FONSECA, J.F.D.; CAMARGO, L.S.D.A.; FERNANDES, C.A.D.C.; BRANDÃO, F.Z. 2010. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 1937-1942.
- AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.R.; SOUSA, F.C.; PEREIRA, A.F.; ALMEIDA, K.C.; MELO, C.H.S.; TELES-FILHO, A.C.A.; BARIL, G.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V. J. F. 2012. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. **Animal Reproduction** 9: 27-32.
- BALDASSARRE H, MATOS DG, FURNUS CC, CASTRO TE, FISCHER EIC, MATOS D.G. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science** 35: 145-150.
- BALDASSARRE, H. 2012. Practical aspects for implementing in vitro embryo production and cloning programs in sheep and goats. **Animal reproduction** 9: 188-194.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science** 82: 255-266.
- BALDASSARRE, H.; RAO, K. M.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; BEGIN, I.; BEHBOODI, E.; HOCKLEY, D. K. 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. **Reproduction, Fertility and Development** 19: 612-616.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology** 57: 275-284.
- BERNARDI, M. L. 2005. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae** 33: 1-16.
- CHAVES, R.M.; AGUIAR FILHO, C.; JÚNIOR, E. S.; ALMEIDA FILHO, J.; DE LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. 2010. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). **Ciência Animal Brasileira** 11: 683-688.
- COGNIE, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology** 51: 105-116.
- CORDEIRO, M.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F.; DI FILIPPO, P.A.; DIAS, D.P.M.; BERETTA, C. A.G.; DÓRIA, R.G.S.; FELICIANO, M.A.R.; COUTINHO, L.N.; VICENTE, W. R. R. 2014. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66: 137-144.
- CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M. P. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility** 103: 293-298.
- CUETO, M.; GIBBONS, A.; ALBERIO, R.; TADDEO, H.; GONZALEZ-BULNES, A. 2006. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. **Animal reproduction science** 91: 275-284.

- DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology** 55: 1211-1239.
- FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T.; LEBOEUF, B. 2011. Ciclo reprodutivo de cabras. **Ciência reprodução animal** 124: 211-219.
- FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M. 2010. In vitro embryo production in small ruminants. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 409-413.
- FREITAS, V.J.F.; ANDRADE, M.L.L.; CAJAZEIRAS, J.B.; LUZ, J.V. 2007. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae** 35: 781-786.
- GINTHER, O.J.; KOT, K. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology** 42: 987-1001.
- GONZALEZ-BULNES, A.; URRUTIA, B.; CARRIZOSA, J.A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. 2004. Ultrasonographic screening of the ovulatory process in goats. **Small Ruminant Research** 52: 165-168.
- GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology** 51: 1099-1119.
- HALDAR, C.; GHOSH, S. 2015. Dynamics and regulation of goat reproduction. **International Journal of Current Research and Academic Review** 3: 20-36.
- HOLTZ, W. 2005. Recent developments in assisted reproduction in goats. **Small Ruminant Research** 60: 95-110.
- IETS, International Embryo Transfer Society. 2014. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett** 33: 14-26
- INMET, Instituto Nacional de Meteorologia Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. 2015a Disponível em:  
[http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera\\_serie\\_txt\\_mensal.php?&mRelEstacao=83244&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/01/2015&mRelDtFim=31/12/2015&mAtributos](http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt_mensal.php?&mRelEstacao=83244&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/01/2015&mRelDtFim=31/12/2015&mAtributos)  
 Acesso em: 20 fevereiro 2015.
- INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Estações automáticas – gráficos. 2015b. Disponível em:  
[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)  
 Acesso em: 20 dezembro 2015.
- JOHNSON, A. L. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science** 78: 185-201.
- MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. 2009. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 33: 171-182.
- MEDAN, M. S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; GROOME, N. P.; TAYA, K. 2003. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. **Biology of Reproduction** 69: 57-63.
- MORAND-FEHR, P.; HERVIEU, J. 1999. Apprécier l'état corporel des chèvres: Intérêt et method. **Reussir La Chevre** 231; 22-34.
- MOSSA, F.; LEONI, G. G.; BERLINGUER, F.; SUCCU, S.; MADEDDU, M.; BEBBERE, D.; NAITANA, S. 2008. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances *in vitro* embryo yield in sheep. **Animal Reproduction Science** 109: 134-145.
- NOCITI, R. P. 2014. Efeitos de diferentes fontes de gordura alimentar na resposta a aspiração folicular de cabras anglo-nubianas. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

- OLIVEIRA, A., NASCIMENTO, A., TORRES, A., DIAS, M., PAULINO, M. F., & FILHO, J. M. P. 2007. Dinâmica folicular na sincronização de ovulação associada à administração de FSH-p em vacas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae** 35: 1119.
- PARAMIO, M.T. 2010. In vivo and in vitro embryo production in goats. **Small Ruminant Research** 89: 144-148.
- RODRIGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; CHAMORRO, C. A.; PAZ, P. D. 2006. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. **Reproduction in Domestic Animals** 41: 106-113.
- ROMAGUERA, R.; CASANOVAS, A.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; CATALÁ, M.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. 2010. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. **Theriogenology** 74: 364-373.
- ROMAGUERA, R.; MOLL, X.; MORATÓ, R.; ROURA, M.; PALOMO, M.J.; CATALÁ, M.G.; JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; HAMMAMIA, S.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. 2011. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. **Theriogenology** 76: 1-11.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal reproduction science** 78: 271-287.
- SANCHEZ, D.J.; MELO, C.H.; SOUZA-FABJAN, J.M.; SOUSA, F.C.; ROCHA, A.A.; CAMPELO, I.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; PEREIRA, A.F.P.; MELO, L.M.; FREITAS, V.J. 2014. Repeated hormonal treatment and laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production in goats raised in the tropics. **Livestock Science** 165: 217-222.
- SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. 2010. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 34: 206-221.
- SEI, Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Tipologia climática koppen. 1997. Disponível em: [http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/mapas/pdf/tipologia\\_climatica\\_segundo\\_koppen\\_2014.pdf](http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/mapas/pdf/tipologia_climatica_segundo_koppen_2014.pdf). Acesso em: 20 março 2016.
- SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. 2006. Follicular dynamics in Serrana goats. **Animal reproduction science** 95: 16-26.
- SIMÕES, J.; POTES, J.; AZEVEDO, J.; ALMEIDA, J.C.; FONTES, P.; BARIL, G.; MASCARENHAS, R. 2005. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. **Animal reproduction science** 85: 263-273.
- SOUSA, F.C.; DE MELO, C.H.S.; DE ALBUQUERQUE TELES FILHO, A.C.; AVELAR, S.R. G.; MOURA, A.D.A.A.; MARTINS, J.A.M.; FREITAS, V.J.F.; TEIXEIRA, D.I.A. 2011a. Ovarian follicular response to different hormonal stimulation treatments in Canindé goats. **Animal reproduction science** 125: 88-93.
- SOUZA, R.S.; BARBOSA, L.P.; AGUIAR, C.S.; FIGUEREDO JÚNIOR, J.; RIBEIRO, M.O.; MENDES, C.S.; ALMEIDA, V.F.; ARAÚJO, R.C.S.A.; PINHEIRO, A.M.; MARQUES, J.A. 2011b. Sincronização da ovulação utilizando FSH em substituição à eCG em cabras. **Arquivo Brasileira Medicina Veterinária Zootecnia** 63: 753-756.
- SOUZA-FABJAN, J.M.; PEREIRA, A.F.; MELO, C.H.; SANCHEZ, D.J.; OBA, E.; MERMILLOD, P.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V.J. 2013. Assessment of the reproductive parameters, laparoscopic oocyte recovery and the first embryos produced in vitro from endangered Canindé goats (*Capra hircus*). **Reproductive biology** 13: 325-332.
- SOUZA-FABJAN, J.M.G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; LOCATELLI, Y.; DE FIGUEIREDO, J.R.; DE FIGUEIRÊDO FREITAS, V.J.; MERMILLOD, P. 2014a. In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. **Theriogenology** 81: 1149-1162.
- SOUZA-FABJAN, J.M.G.; LOCATELLI, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; TOUZÉ, J.L.; PERREAU, C.; BECKERS, J.F.; FREITAS, V.J.F.; MERMILLOD, P. 2014b. In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up–derived oocytes have

different kinetics and requirements regarding maturation media. **Theriogenology** 81: 1021-1031.

TEIXEIRA, D.I.A.; LOPES JUNIOR, E.S.; SOUSA, F.C.; PINHEIRO, E.S.P.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E.; FREITAS, V.J.F. 2008. The use of real-time ultrasonography to select embryo donors participating in a transgenesis programme. **Small Ruminant Research** 76: 215-219.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; DA SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; SILVA, M.A.M.; VASCONCELOS, R.O.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.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.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; SILVA, A.D.S.L.D.; BARROS, F.F.P.D.C.; COUTINHO, L.N.; SILVA, M.A.M.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; VRISMAN, D.P.; CONCEIÇÃO, M.E.B.A.M.; VICENTE, W. R. R. 2015. Ovum pick-up technique in recently weaned ewe lambs subjected to ovarian stimulation. **Acta Scientiae Veterinariae** 1: 1-9.

TENORIO FILHO, F.; SANTOS, M. H. B.; CARRAZZONI, P. G.; PAULA-LOPES, F. F.; NEVES, J. P., BARTOLOMEU, C. C.; OLIVEIRA, M. A. L. 2007. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. **Small Ruminant Research** 72: 51-56.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; LENZ SOUZA, M. I.; NARVÁEZ-SOLARTE, W. 2015. Follicular development in Alpine goats during the mating season. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia** 10: 38-44.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; OBA, E.; SOUZA, M. I. L. 2008. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60: 58-65.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; SOUZA, M. I. L.; OSORIO, J. H. 2010. Resposta ovariana de cabras submetidas a implantes de progesterona seguidos de aplicações de gonadotrofina coriônica eqüina. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 1214-1222.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology** 63: 1717-1751.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. 2003. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Scientiae Veterinariae** 31: 188-205.

VÁZQUEZ, M. I.; BLANCH, M. S.; ALANIS, G. A., CHAVES, M. A.; GONZALEZ-BULNES, A. 2010. Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. **Animal reproduction science** 118: 42-47.

## **INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

No presente trabalho foi gerado um artigo intitulado: Resposta folicular ovariana e produção oocitária de cabras submetidos a protocolos de estimulação ovariana. O mesmo foi encaminhado para publicação Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, com Qualis B<sub>2</sub> na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.