



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

ALBERTO MANSUR GHETTI

**CARACTERIZAÇÃO POR DOPPLER COLORIDO DO PADRÃO VASCULAR
EM FOLÍCULOS DOMINANTES PRÉ E PÓS ASPIRAÇÃO E EFEITO DO
BENZOATO DE ESTRADIOL NOS FOLÍCULOS RESIDUAIS
SUBSEQUENTES**

NITERÓI

2012

ALBERTO MANSUR GHETTI

**CARACTERIZAÇÃO POR DOPPLER COLORIDO DO PADRÃO VASCULAR
EM FOLÍCULOS DOMINANTES PRÉ E PÓS ASPIRAÇÃO E EFEITO DO
BENZOATO DE ESTRADIOL NOS FOLÍCULOS RESIDUAIS
SUBSEQUENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Coorientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

NITERÓI
2012

G418 Ghetti, Alberto Mansur

Caracterização por Doppler colorido do padrão vascular em folículos dominantes pré e pós aspiração e efeito do benzoato de estradiol nos folículos residuais subsequentes/ Alberto Mansur Ghetti; orientador Felipe Zandonadi Brandão. – 2012.

100f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2012.

Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. Ultrassonografia doppler. 2. Bovino.
3. Vascularização. I. Título.

CDD 636.0896075

**CARACTERIZAÇÃO POR DOPPLER COLORIDO DO PADRÃO VASCULAR
EM FOLÍCULOS DOMINANTES PRÉ E PÓS ASPIRAÇÃO E EFEITO DO
BENZOATO DE ESTRADIOL NOS FOLÍCULOS RESIDUAIS
SUBSEQUENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 24 de abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. João Henrique Moreira Viana – Coorientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Universidade José do Rosário Vellano

Prof. Dra. Márcia Carolina Salomão Santos
Faculdade de Veterinária – UFF

Prof. Dr. Carlos Otávio de Paula Vasconcelos
Faculdade de Veterinária – UFF

NITERÓI
2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por me dar apoio em todas as minhas empreitadas e pela paciência e suporte nos momentos mais difíceis. Não seria possível sem vocês.

A toda a minha família que sempre demonstra apoio e compreensão nas minhas decisões.

Ao professor e orientador Felipe Zandonadi Brandão, por toda a dedicação e preocupação com meu trabalho, por todos os conselhos e orientações, para que não só a dissertação, mas também todo o mestrado pudesse ser aproveitado e bem elaborado.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana e coorientador, que desde a época de graduação vem se dedicando a me ensinar e dividir seus conhecimentos. Seu conhecimento e dedicação nos leva a tê-lo como exemplo a ser seguido.

Ao professor Miller Palhão, pela amizade, conversas, e discussões sobre o trabalho, ajuda e principalmente pelas ideias que deram início a toda essa pesquisa.

Aos meus amigos Luis Gustavo e Eduardo Arashiro que foram fundamentais para a elaboração dos experimentos. Por toda a dedicação e ajuda nos momentos mais importantes.

Ao meu amigo Gilmar Alvim (Del) e todos do laboratório de reprodução da Embrapa que sempre estiveram disponíveis para ajudar no possível e impossível!

Ao meu amigo Álvaro Borba que esteve presente e ajudou de maneira incrível nos experimentos e além de tudo se tornou um grande amigo, uma pessoa que sei que posso confiar em qualquer momento.

Aos amigos do mestrado que me receberam de braços abertos no Rio de Janeiro e Niterói. Vocês não sabem a importância da amizade de vocês no momento em que várias mudanças e coisas novas apareciam na minha vida.

Aos professores da Pós-graduação da UFF pelo compartilhamento do conhecimento e por todos os ensinamentos.

Aos funcionários da Embrapa Gado de Leite pela disposição e ajuda em todos os momentos.

À professora Dr. Eunice Oba pela disponibilização do laboratório para a realização das análises hormonais.

Aos meus amigos, que fiz pela vida, meus amigos que se preocupam comigo. Os amigos antigos e os novos (agora administradores) que estão comigo a todos os momentos, sejam eles por presença física ou mesmo em pensamento. A amizade de vocês é combustível para minha vida!!

À FAPEMIG pelo apoio ao projeto que pertencia este estudo.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste estudo!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi utilizar o recurso Doppler do exame ultrassonográfico para avaliar a vascularização de folículos pré e pós-aspiração folicular e avaliar o efeito do benzoato de estradiol nos folículos residuais subsequentes. No primeiro ensaio foi estudada a vascularização do folículo pré-ovulatório, objetivando-se testar diferentes metodologias de avaliação da vascularização folicular e determinar um padrão de referência para folículos pré-ovulatórios. No segundo ensaio, já com o padrão de vascularização do folículo pré-ovulatório definida, foi determinado o perfil de vascularização do folículo residual formado após a aspiração folicular, de forma a gerar informações que possam auxiliar na compreensão desse fenômeno. No terceiro estudo, foi avaliado o uso do benzoato de estradiol no momento da aspiração folicular como estratégia para limitar a formação de folículos residuais. Conclui-se que a tecnologia Doppler é eficiente para avaliar o padrão vascular de folículos pré-ovulatórios e residuais. A utilização do benzoato de estradiol é uma estratégia para minimizar a atividade estrogênica de folículos residuais formados após a aspiração, minimizando uma possível influência sobre a onda folicular subsequente.

Palavras-chave: benzoato de estradiol, bovinos, folículo pré-ovulatório, folículo residual, ultrassonografia Doppler, vascularização.

ABSTRACT

The aim of this study was to use the feature of Doppler ultrasonography to evaluate the vascularity of follicles before and after ovum pick up and evaluate the effect of estradiol benzoate in subsequent residual follicles. In the first experiment it was studied the vascularity of the preovulatory follicle, aiming to test different methodologies for evaluation of follicular vascularization and set a benchmark for pre-ovulatory follicles. In the second trial, since the pattern of vascularization of the preovulatory follicle defined, it was defined a pattern for vascularization of residual follicles formed after ovum pick up, in order to generate information that can help in understanding this phenomenon. In the third study, we evaluated the use of estradiol benzoate at the time of follicle aspiration as a strategy to limit the formation of residual follicles. It is concluded that the Doppler technology is effective to evaluate vascular pattern of preovulatory and residuals follicles. The use of estradiol benzoate is a strategy to minimize residual estrogenic activity of follicles formed after aspiration, minimizing a possible influence on subsequent follicular wave.

Keywords: estradiol benzoate, bovine, preovulatory follicle, residual follicle, Doppler ultrasonography, vascularization.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. Folículos tomados como parâmetro para classificação de escore para vascularização, (a) escore 4 (0 a 25%), (b) escore 3 (25 a 50%), (c) escore 2 (50 a 75%), (d) escore 1 (75 a 100%). 46
- Figura 2. Cálculo da área de vascularização e da área da parede do folículo na imagem de maior diâmetro. 47
- Figura 3. Relação entre percentual de vascularização e ocorrência das avaliações objetivas no modo de histograma. 49
- Figura 4. O gráfico em blox plot demonstra o resultado da comparação entre a avaliação subjetiva com a objetiva da vascularização do folículo pré-ovulatório. 50
- Figura 5. Gráfico de distribuição de vascularização dos folículos pré-ovulatórios nas avaliações objetivas e subjetivas. 51

Capítulo 2

- Figura 1. Sistema adaptado para coleta do líquido folicular, com microtubo posicionado dentro do tubo Falcon. 64
- Figura 2. Cálculo da área de vascularização e da área interna e externa do folículo residual através de uma função do próprio aparelho. 65
- Figura 3. Sequência de imagens representando na ordem, (a) o momento da aspiração, (b) 24h, (c) 48h e (d) 72h pós-aspiração. É possível observar a presença de um coágulo hiperecótico indicados pelas setas no interior do folículo nas imagens pós-aspiração. 68
- Figura 4. Representação da vascularização do folículo aspirado 24h, 48h e 72h, demonstrando claramente o aumento, atingindo seu potencial máximo por volta de 48h, seguido de uma diminuição da vascularização. 69
- Figura 5. Relação do percentual de vascularização em função do tempo de avaliação. O percentual foi considerado pela razão entre a área de vascularização e a parede do folículo (cm^2). 71

Capítulo 3

- Figura 1. Medidas dos folículos residuais (mm) em função do tempo pós-aspiração. 86

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental Dr. José Henrique Buschi 43

Tabela 2. Avaliação subjetiva da área de vascularização dos folículos pré-ovulatórios 48

Tabela 3. Avaliação objetiva da área de vascularização do folículo pré-ovulatórios de vacas mestiças Holandês-Zebú 50

Capítulo 2

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental de Coronel Pacheco (média \pm desvio padrão). 61

Tabela 2. Características dos folículos pré aspiração em função do perfil esteroidogênico 67

Tabela 3. Médias e desvio padrão da área da parede do folículo residual, área de vascularização do folículo residual e percentual de vascularização nos diferentes tempos pós punção folicular 70

Capítulo 3

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental de Coronel Pacheco (média \pm desvio padrão). 80

Tabela 2. Resultado dos folículos residuais após tratamento com Benzoato de estradiol 85

Tabela 3. Taxa de crescimento do folículo residual de acordo com o grupo de tratamento. 85

Tabela 4. Perfil esteroidogênico dos folículos previamente a aspiração folicular 87

Tabela 5. Perfil esteroidogênico dos folículos residuais formados após a aspiração folicular 87

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-2 – Angiotensina -2
BE – Benzoato de estradiol
COC – Complexo cumulus oócito
CL – Corpo Lúteo
cm- Centímetros
ET-1 – Endotelina-1
E2 - Estradiol
FCEV- Fator de crescimento endotelial vascular
FF – Fluido folicular
FD – Folículo dominante
FR – Folículo residual
FS- Fluxo sanguíneo
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina
H- Horas
Hz- Hertz
KHz- kilohertz
LH – Hormônio Luteinizante
LF – Líquido folicular
m/s- Metros por segundo
mg- Miligramas
mL- Mililitros
mhz- Megahertz
mm – Milímetros
PNA – Peptídeo Natriurético atrial
PRF - Frequência de Repetição de Pulso
PVA – Peptídeo Vasoativo
P4 – Progesterona
PGF2 α – Prostaglandina
US – Ultrassom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 ULTRASSONOGRAFIA NO ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR	15
2.1.1 Ultrassonografia modo B	15
2.1.2 Ultrassonografia Doppler	17
2.2 AVANÇOS NO ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR DECORRENTES DA ULTRASSONOGRAFIA	19
2.2.1 Caracterização do crescimento e atresia folicular	19
2.2.2 Fisiologia, controle endócrino e esteroidogênese folicular	22
2.2.3 Fluxo sanguíneo, ambiente intrafolicular e desenvolvimento do oócito	24
2.3 ULTRASSONOGRAFIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)	27
2.3.1 Aspiração folicular para a PIVE	27
2.3.2 Efeitos da OPU na fisiologia ovariana	27
2.3.3 Formação de Folículo Residual	29
3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31
CAPÍTULO 1	40
Resumo	40
Abstract	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 Localização, período experimental e condições climáticas	43
2.2 Animais experimentais	44
2.3 Delineamento experimental	44
2.4 Avaliações ultrassonográficas	44
2.5 Análise das imagens	45
2.6 Análise estatística	47
3. RESULTADOS	48

4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56
CAPÍTULO 2	58
Resumo	58
Abstract	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1 Localização, período experimental e condições climáticas	61
2.2 Animais experimentais	61
2.3 Protocolo de sincronização	62
2.4 Delineamento experimental	62
2.5 ultrassonografia/ Dinâmica folicular	63
2.6 Punção folicular	63
2.7 Análise das imagens	64
2.8 Análise de concentrações de estrógeno e progesterona	65
2.9 Análise estatística	66
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	66
4. CONCLUSÃO	73
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	74
CAPÍTULO 3	77
Resumo	77
Abstract	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1 Localização, período experimental e condições climáticas	80
2.2 Animais experimentais	81
2.3 Protocolo de sincronização	81
2.4 Delineamento experimental	81
2.5 ultrassonografia	82
2.6 Punção folicular	82

2.7 Análise de concentrações de estrógeno e progesterona	83
2.8 Análise estatística	84
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	84
4. CONCLUSÃO	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
6. CONCLUSÃO GERAL	95
7. ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio nacional assumiu uma posição aonde áreas como pecuária, produção de biocombustíveis e produção de grãos permitiram que o país se destacasse em uma posição de liderança em relação a produção mundial. No caso específico da pecuária, o Brasil hoje é referência na produção de carne e leite (FAO, 2008). Entretanto, o país necessita continuar investindo em pesquisa e desenvolvimento para garantir maior eficiência nos sistemas de produção.

A necessidade de ganhos em competitividade torna indispensável aos produtores rurais o investimento em tecnificação e organização da atividade, assim como em assistência técnica adequada. O uso da ultrassonografia no campo é uma ferramenta que possibilita um aumentando na eficiência e dinamizando a produção.

A ultrassonografia é uma tecnologia não invasiva e que possibilita, na área de reprodução, aumentar a eficiência e precocidade dos diagnósticos e, conseqüentemente, da tomada de decisão. A utilização da ultrassonografia Doppler para a avaliação da vascularização é uma inovação que possibilita o maior conhecimento das condições fisiológicas dos órgãos genitais, em todas as fases do ciclo estral (MIYAMOTO et al., 2006). Esta tecnologia pode levar a avanços na investigação da fisiologia e de condições patológicas do sistema reprodutivo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007), como no caso da avaliação do fluxo sanguíneo ovariano e sua relação com o estado fisiológico de folículos e corpos lúteos (MATSUI e MYIAMOTO, 2009).

A avaliação da área de vascularização no folículo pré-ovulatório e sua possibilidade de utilização na predição do tempo ótimo de inseminação e aspiração folicular para fertilização *in vitro* já foi descrita em humanos (BRANNSTROM et al., 1998).

A aspiração folicular é um procedimento consolidado como técnica de referência para a recuperação de complexos cumulus-oócito (COC) e produção *in vitro* de embriões. VIANA et al. (2001) descreveu a formação de folículos residuais após a aspiração e suas implicações para a esteroidogênese

ovariana. Inexistem, contudo, estudos que utilizem a tecnologia Doppler para avaliar alterações vasculares relacionadas ao período posterior à aspiração, bem como, na avaliação de folículos residuais formados após o procedimento.

O presente estudo teve como objetivo utilizar a tecnologia Doppler para avaliar a vascularização ovariana nos períodos pré-ovulatório e pós-aspiração folicular, como ferramenta para determinação de um padrão vascular e também avaliar o uso do benzoato de estradiol na dinâmica de formação do folículo residual, elaborados em três ensaios que serão apresentados na forma de capítulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ULTRASSONOGRAFIA NO ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR

2.1.1 Ultrassonografia modo B

A ultrassonografia consiste em uma técnica não invasiva que permite a avaliação dos diversos órgãos e tecidos que compõe o aparelho reprodutor de machos e fêmeas. O ultrassom (US) vem sendo utilizado como uma ferramenta revolucionária na biologia da reprodução. A utilização da ultrassonografia juntamente com a ferramenta para ensaios hormonais (RIA) possibilitou a associação entre as mudanças morfológicas, hormonais e outras variações funcionais (GRIFFIN e GINTHER, 1992).

A ultrassonografia se baseia na ativação de cristais piezoelétricos que emitem vibrações sonoras, que são transmitidas pelos tecidos corporais e posteriormente refletidas, de acordo com a propagação do som no meio (BLOND e BUCZINSKI, 2009). O transdutor é ativado a partir da alternância de polaridade por uma carga elétrica, resultando na compressão e expansão de ondas para dentro do tecido. Para medição desses valores temos: a amplitude que é a medida de força da onda ultrassônica, o comprimento de onda, que está relacionado ao tamanho da onda; a frequência, que é o número de vibrações ou oscilações por unidade de tempo. Normalmente a unidade de

tempo utilizada é o segundo e a frequência pode ser mensurada em Hertz (Hz), que seria um ciclo por segundo ou então em mega-hertz (MHz) que seria um milhão de ciclos por segundo. A alteração da frequência interfere na resolução da imagem, altas frequências melhoram a resolução, porém diminuem a área de penetração tecidual (GINTHER, 1998)

O modo B, também chamado de modo bidimensional, é uma projeção de tons de cinza representados em um monitor. O aparelho de ultrassonografia é composto por um gerador de pulsos elétricos, um transdutor, que emite os sinais sonoros e capta a resposta de eco, um conversor e uma tela de vídeo. Os transdutores podem variar formato, dependendo da finalidade do exame. O transdutor linear produz uma imagem retangular, ao passo que o setorial produz uma imagem em formato de setor circular com ângulo variável de acordo com o aparelho. As estruturas que não refletem o som aparecem em tom de preto na imagem do monitor e são chamadas de não ecogênicas ou anecóicas. Por outro lado os tecidos que refletem o som aparecem em variados tons de cinza e são caracterizados como estruturas ecogênicas, podendo ser hiperecóicas, quando mais claras (ou tendendo ao branco), ou hipoecóicas, quando os tons de cinza forem mais escuros (IHNATSENKA B e BOEZAART, 2010)

A maioria dos aparelhos de ultrassonografia ainda é de tecnologia analógica, sendo difícil a visualização de folículos de diâmetro abaixo de 2 a 3 milímetros (mm), limitando o acompanhamento de folículos no início da emergência folicular e também causando uma baixa precisão na avaliação de folículos em sua fase de seleção e dominância (JAISWAL et al. 2004).

O recente desenvolvimento de novas plataformas para equipamentos de ultrassonografia, contudo, vem resultando em uma “revolução silenciosa” no desenvolvimento de pesquisas em fisiologia ovariana (SINGH et al., 2003). O desenvolvimento de novas tecnologias nos aparelhos vem a cada dia melhorando a capacidade e a resolução de visualização de estruturas, permitindo, por exemplo, a visualização de folículos de até 1 mm (ADAMS et al., 2008). A utilização de equipamentos de alta frequência (até 60 MHz) tornou possível a visualização das histológicas no folículo ovariano, permitindo em

alguns casos, a identificação direta do complexo cumulus oócito (COC) no ambiente folicular (SINGH et al., 2003).

Dentro da clínica de grandes animais, o uso da ultrassonografia é bem difundido, principalmente na reprodução animal. Nesta área o equipamento é útil na detecção de enfermidades (KAHN e LEIDL, 1984), diagnósticos precoces de gestação e sexagem fetal (KAHN et al., 1990) e acompanhamento reprodutivo (BISINOTTO et al. 2011).

2.1.2 Ultrassonografia Doppler

A teoria do Doppler foi criada por Christian Doppler em 1842. Segundo consta a variação da distância entre o emissor e o receptor de uma onda, causa uma variação entre a frequência emitida e a recebida. Esta variação da frequência é proporcional à velocidade relativa entre emissor e receptor, podendo ela ser positiva, se houvesse aproximação, ou negativa, quando houver distanciamento entre o emissor e o receptor (COMAN, 2005).

Com o passar do tempo, a teoria de Doppler abriu caminho para várias aplicações. Uma delas foi à adaptação da função Doppler em aparelhos de US, onde pela variação da emissão de um sinal sonoro e os ecos refletidos pelas células vermelhas, permitiu obter a chamada diferença Doppler (GERHARD-HERMAN et al., 2006).

Na ultrassonografia Doppler colorida, existem duas funções de avaliação, uma qualitativa e uma quantitativa, a função color flow e o modo espectral, respectivamente.

Nos aparelhos contendo a função color flow, a diferença Doppler é transmitida ao monitor em forma de cores. Se esta diferença for positiva, ou seja, quando o fluxo sanguíneo ocorre em direção do transdutor, o mesmo é representado pela cor vermelha. Se ela for negativa, quando o fluxo ocorre em direção contrária ao transdutor, este é representado pela cor azul. Essas tonalidades de cores podem ser mais ou menos intensas, dependendo da intensidade e amplitude do fluxo sanguíneo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007).

Esta tecnologia vem sendo utilizada para diversas áreas e funções. O Doppler vem sendo empregado em humanos mais rotineiramente do que em animais. Esta técnica ajuda médicos a detectarem gestações de alto risco através de avaliações do fluxo sanguíneo da artéria umbilical, possibilitando prever cada vez mais precocemente as condições intrauterinas e diagnosticar situações de sofrimento fetal (FITZGERALD e DRUMM, 1977; GUDMUNDSSON e MARSAL, 1988; DICKEY, 1997). Em animais, a tecnologia Doppler vem sendo utilizada há menos tempo, porém já existem trabalhos que discutem a avaliação da vascularização ovariana (ACOSTA et al. 2002, 2003, 2005; MIYAMOTO et al. 2005) e da avaliação da circulação sanguínea distribuída pelo útero durante os diferentes estágios do ciclo estral e durante a gestação (BOLLWEIN et al., 2000, 2002). Estudos relacionados ao Doppler descreveram técnicas de diagnóstico de cistos, avaliação da função do corpo lúteo (CL), avaliação precoce de diagnóstico de gestação, diagnósticos precisos de morte fetal e melhor avaliação de resposta superovulatórias (MATSUI e MIYAMOTO, 2009).

No modo espectral, avaliam-se as variações de fluxo sanguíneo através de gráficos. Estes gráficos, também chamados de spectrum, fornecem ao operador, diferentes valores de velocidades de fluxo. Todos estes valores são referentes a velocidades das hemácias durante o ciclo cardíaco (GINTHER et al., 2007). A pouca utilização do modo espectral na avaliação ovariana em bovinos é devida a dificuldade de contenção do animal e principalmente pelo pequeno tamanho dos vasos, além da necessidade de ajuste do ângulo de avaliação entre o vaso e o transdutor (ACOSTA e MYIAMOTO, 2004).

Diferente da avaliação espectral, o color flow é um método mais simplificado, consumindo menor tempo de exame, sendo a preferida pelos veterinários que atuam no campo. Dentro da função color flow é possível também utilizar o modo power flow. Onde apenas uma cor é apresentada e as variações nos sinais de Doppler se apresentam como diferenças na intensidade dos pontos coloridos (GINTHER et al., 2007).

Na avaliação qualitativa das imagens de Doppler em animais, o objetivo do fluxo sanguíneo através de uma interpretação subjetiva do número e do

brilho dos pixels, que representam a quantidade de som produzida pela diferença Doppler (MARSAL, 1993).

Dentre as principais aplicações do Doppler em reprodução de fêmeas bovinas está à avaliação da função ovariana, que engloba o desenvolvimento folicular e a dinâmica luteal durante o ciclo estral (MATSUI e MIYAMOTO, 2009).

Em humanos, o modo espectral e o modo colorido são utilizados em diferentes fases e regiões do folículo pré-ovulatório (BRANNSTROM et al., 1998). Poucos e apenas recentes estudos demonstram a avaliação de folículos pré-ovulatórios utilizando a tecnologia Doppler em vacas (ACOSTA e MYIAMOTO, 2004; KAWASHIMA et al. 2007; NEGLIA et al., 2011a). O LH produz um aumento do fluxo sanguíneo (JANSON, 1975; NISWENDER et al., 1976; VARGA et al., 1985), durante o período pré-ovulatório que o primeiro aumento do fluxo sanguíneo na parede do folículo ocorreu seis horas antes do pico de hormônio luteinizante (LH) (ACOSTA et al., 2003). O mecanismo pelo qual o LH promove este efeito ainda não é conhecido, uma vez que, este hormônio não tem nenhum efeito direto sobre a vascularização (VARGA et al., 1985). O folículo pré-ovulatório se distingue de um atrésico de diâmetro semelhante, pela presença de uma região bem vascularizada ao seu redor. (ACOSTA et al., 2003).

2.2 AVANÇOS NO ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR DECORRENTES DA ULTRASSONOGRAFIA

2.2.1 Caracterização do crescimento e atresia folicular

O crescimento folicular é marcado por várias alterações celulares e moleculares que envolvem os principais componente foliculares: o oócito, as células da teca e as células da granulosa. Os responsáveis por essas transformações são fatores intrafoliculares, fatores intraovarianos e sinais hormonais que controlam as atividades celulares e levam a secreção de progestágenos, andrógenos e estrógenos. No processo de crescimento

folicular, a profiliação e diferenciação de células da granulosa e da teca são induzidas por hormônios, o que leva estes folículos em produzir estrógeno e responder em gonadotrofinas. O estrógeno tem grande importância para a definição de qual folículo irá assumir a dominância, já que este hormônio determina a quantidade de receptores de LH este folículo terá, influenciando posteriormente no momento de dominância, ovulação e luteinização (HAFEZ e HAFEZ, 2004)

Sunderland et al. (1994) definiram que os folículos ovarianos passam por diferentes fases durante as ondas de crescimento: recrutamento, crescimento, seleção, dominância e atresia, tudo isto resultando em um desenvolvimento cíclico de folículos ovulatórios ou não ovulatórios ao longo de um ciclo estral bovino.

Após o recrutamento de um conjunto de folículos no início de uma onda de crescimento, ocorre a seleção e o estabelecimento da dominância. Em bovinos, em média, o maior folículo apresenta 3 ou 4 mm no momento da emergência da onda (GINTHER et al., 1997). A partir deste momento, o crescimento do folículo dominante (FD) diverge em relação aos demais, que passam a ser denominados subordinados. A divergência ocorre quando o maior folículo atinge aproximadamente 8,5 mm, como indicado por vários estudos em raças taurinas (KULICK et al., 1999; GINTHER et al. 2000b). Após a divergência os folículos subordinados começam a regredir e entram em atresia (GINTHER et al. 1996). Dentro de uma onda folicular, todos os folículos apresentam potencial para se tornar dominantes. Entretanto, apenas um folículo consegue estabelecer esse padrão, principalmente devido a diferenças na expressão de receptores para LH e hormônio folículo estimulante (FSH) e a inibição da liberação de FSH endógeno pela produção de estradiol e inibina (KO et al., 1991).

Durante a presença de um CL ativo, os pulsos de LH variam quanto a sua frequência e amplitude, mas são insuficientes para promover a maturação final e a posterior ovulação do FD (RAHE et al., 1980). Sendo assim, o futuro desse folículo dominante durante o momento de P4 elevada é a atresia. Com o crescimento do folículo há um aumento na quantidade de fluido folicular, rico

em E2 e inibina, que na circulação passam a fazer um feedback positivo/negativo sobre o hipotálamo e hipófise com aumento da liberação de LH e diminuição de FSH, suprimindo o crescimento dos demais folículos (ROCHE, 1996). Com início da atresia a concentração de E2 e inibina do folículo dominante tende a cair, promovendo assim, o final do feedback negativo promovido por eles ao FSH no hipotálamo. Com isso, o FSH pode aumentar sua concentração e promover o crescimento da onda subsequente (MIHM et al. 2002).

A atresia folicular não é classificada somente pela morte de algumas células, mas sim pela perda total da função, caracterizada pela falha na função bioquímica e alteração morfológica (RODGERS e IRVING-RODGERS, 2010). Neste processo estão envolvidas várias atividades celulares, com a função de reabsorção do folículo pela infiltração de macrófagos, fagócitos e fibroblastos na teca, e substituir por tecido fibroso, semelhante ao processo de cicatrização (SCHULTZ e WY SOCKI, 2009).

O começo da morte celular se dá de forma variada, em diferentes fases. Diferentes células apresentam início de apoptose de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Rajakoski (1960) identificou em bovinos, que no período pré antral, o oócito é a primeira célula a apresentar apoptose. Já no período antral, as células da granulosa, são as primeiras células a morrer e em alguns casos células da teca podem morrer bem precocemente (CLARK et al., 2004). Distúrbios na habilidade das células da teca e granulosa em responder aos sinais gonadotróficos levam ao interrompimento do crescimento e início da atresia do folículo (KNIGHT et al., 2011).

Alguns fatores são limitantes quando se trata de atresia. As células possuem uma “programação” de vida, com isso fica determinada a sua meia vida, o que limita o crescimento e desenvolvimento do folículo. Outros fatores afetam esse tempo de vida, como a própria nutrição, o equilíbrio entre estrógenos e andrógenos e os estágios do ciclo reprodutivo. O estrógeno (E2) e a P4 são hormônios decisivos no que se trata de atresia. O estrógeno estimula o crescimento e a diferenciação das células da granulosa, o que é fundamental para a seleção do folículo, para a maturação e ovulação.

2.2.2 Fisiologia, controle endócrino e esteroidogênese folicular

Os bovinos são animais poliéstricos que exibem comportamento de estro entre períodos médios de 21 dias. O ciclo estral é caracterizado por ondas de crescimento folicular e controlado por diversos hormônios de diferentes origens. Estes hormônios podem ser hipotalâmicos, como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (ROCH et al., 2010), da hipófise (FSH e LH) (BERGFELT et al., 2000; LUO et al., 2010), dos ovários (P4; e inibina - GINTHER et al., 2000b; FORDE et al., 2010) ou ainda do útero como o caso da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (AROSH et al., 2004). Eles agem de modo a ativar ou suprimir ações que controlam o ciclo.

À medida que o FSH aumenta sua concentração, ocorre aumento concomitante de receptores para o próprio FSH e para o LH nas células foliculares da teca interna e granulosa. Este momento é marcado pela secreção de E2 pelo folículo em crescimento devido ao aumento do FSH que leva a um aumento na atividade da enzima aromatase (P450arom), enzima esta que converte andrógenos em estrógeno nas células da granulosa, que são produzidos e repassados pela teca interna, chegando assim até a circulação sanguínea (HILLIER, 1994).

Devido ao fato deste futuro folículo dominante ter mais receptores para LH (GINTHER et al., 2000a), ele consegue continuar seu desenvolvimento, mesmo em um ambiente de diminuição de FSH, enquanto os outros folículos subordinados iniciam o processo de morte celular e atresia (GINTHER et al., 2000a).

Após o estabelecimento da dominância, o FD continua a produzir elevadas concentrações de E2, chegando até o pico de produção (PALHÃO et al. 2010). O aumento na concentração de E2 folicular é maior que na concentração de E2 plasmática levando o animal a apresentar comportamento de cio e induzindo o posterior pico de LH. Responsável pela luteinização das células foliculares (ALILA e HANSEL, 1984), maturação final do oócito e ovulação do folículo com liberação do oócito (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Após a ovulação inicia-se o período luteal, onde há a formação do corpo lúteo (CL) e produção de P4. Neste momento, o folículo limita-se até a divergência e estabelecimento da dominância, porém não ocorre a ovulação, pois, o fornecimento necessário de LH para este evento é suprimido (GINTHER et al., 2000b). A função principal do CL é produzir P4 suficientemente para manter a gestação (FORDE et al., 2009). A presença de um CL ativo, em um momento em que não foi detectado sinal de gestação, pelo principal sinalizador de gestação (interferon tau) ocorre à liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero, para a lise do CL (LAMOTHE et al., 1977).

A produção ovariana de esteróides é importante para o desenvolvimento e funcionamento ovariano. A esteroidogênese ovariana ocorre com a interação dos dois tipos de camadas celulares que envolvem o folículo, as células da teca e as células da granulosa (SPICER et al., 2011).

O E2 é sintetizado nas células da granulosa através da aromatização (enzima P450 aromatase), de andrógenos produzidos nas células da teca (FORTUNE e QUIRK, 1988). A produção de E2 é mediada pela frequência de pulsos de LH dos folículos que estão em crescimento (CROWE et al., 2001). A ligação de LH no seus receptores nas células da teca promovem uma conversão de colesterol em testosterona, passando por várias reações catalíticas (DORRINGTON et al., 1975). Esta testosterona produzida nas células da teca, difundem-se através das células da granulosa onde são finalmente convertidas em estrogênio pela P450 arom (DORRINGTON et al., 1975).

A função do estradiol não é apenas local, no folículo em desenvolvimento, também apresenta um importante papel no mecanismo de controle hormonal entre as gônadas, hipófise e hipotálamo (MICEVYCH e KELLY, 2012)

2.2.3 Fluxo sanguíneo, ambiente intrafolicular e desenvolvimento do oócito

As mudanças na hemodinâmica ovariana estão diretamente ligadas aos processos de transformação folicular durante os diferentes momentos do ciclo estral, incluindo crescimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise (COLLINS et al., 1991; BRANNSTROM et al., 1998; ACOSTA et al., 2002).

As mudanças no fluxo sanguíneo e na sua intensidade promovem alterações diretas na biossíntese de E2 e P4 (MURDOCH et al., 1986; ACOSTA et al., 2002). Estas mudanças se dão devido aos peptídeos vasoativos (PVA), que são biomoléculas encontradas na circulação sanguínea. Cada tecido possui uma necessidade de atuação desses PVA por isso possuem diferentes tipos de receptores que influenciam nesta ação. Esses peptídeos são controlados, em parte, por pré propeptídeos, os quais hidrolisam os PVA com enzimas localizadas nos próprios pontos de liberação. Essas enzimas que hidrolisam os peptídeos possuem papel importante no controle do tônus vascular. Alguns PVA como angiotensina-2 (Ang-2), endotelina-1 (ET-1) e peptídeo natriurético atrial (PNA) possuem função de modulação do tônus vascular na circulação. A ligação desses peptídeos com a reprodução, mais especificamente com a hemodinâmica ovariana, está relatada em alguns estudos que mostram a regulação da Ang-2, ET-1 e PNA em eventos como a maturação dos oócitos (YOSHIMURA et al., 1996), a ovulação (PELLICER et al., 1988) e a regulação do CL (STIRLING et al., 1990).

Yamada et al. (1994) comprovou em folículos pré-ovulatórios que o aporte nutricional das células da teca ocorre devido a existência de uma rede de capilares que passa por essa camada. Essa rede está estruturada até a proximidade das células da granulosa, porém não penetrando nesta camada. Isto indica que a nutrição e o estímulo hormonal alcança as células da granulosa por meio de difusão.

No momento da ovulação, o fluxo sanguíneo é de extrema importância para a chegada de agentes mediadores e hormônios, e os PVAs atuantes no momento de pico de LH, principal causador de alterações na estrutura e

bioquímica dos folículos. Estudos mostram a interação deles com a produção de hormônios esteróides e prostaglandinas que também atuam nesse momento (ACOSTA et al., 1999).

A vascularização ovariana pode ser avaliada com auxílio da tecnologia Doppler, pela comparação dos eventos de mudanças do fluxo sanguíneo com parâmetros morfológicos e endócrinos. MATTIOLI et al.(2001) conseguiu, em seus estudos, relacionar o diâmetro do folículo ovariano, concentrações de estrógeno intrafoliculares e a área de fluxo sanguíneo, indicando a possibilidade de associação da ultrassonografia modo B, Doppler colorido e análise hormonal. Seus estudos sugerem que o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) tem relação direta com o aumento na extensão dos vasos, possibilitando maior fluxo sanguíneo e com a ativação da esteroidogênese. A presença do FCEV está intimamente ligada ao tamanho do folículo. Pequenos folículos possuem pequenas quantidades de FCEV, porém folículos em crescimento apresentam grandes quantidades desse fator.

A vascularização folicular tem relação direta com a composição do fluido folicular (FF) e com a tensão de oxigênio, que por sua vez afetam o desenvolvimento oocitário (SULTON et al., 2003). A avaliação do fluxo sanguíneo folicular mostrou ter valor preditivo nos resultados da fertilização *in vitro* em humanos, considerando-se o potencial de implantação dos embriões e as taxas de gestação (CHUI et al., 1997). CHUI et al.(1997) utilizaram mulheres sem diferença significativa de idade ou número de folículos, e chegaram a um resultado que as gestações ocorriam em folículos com maior grau de vascularização. Assim, demonstrou a possibilidade da utilização da avaliação da vascularização folicular como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de uma possível concepção. Contudo, apenas recentemente esta tecnologia passou a ser empregada em grandes animais para avaliação da função ovariana (MIYAMOTO et al., 2006).

Miyamoto et. al. (2006) confirmaram que as mudanças estruturais e funcionais causadas pelo LH, em folículos maduros estão associadas ao aumento do fluxo sanguíneo na parede dos folículos. Eventos como esse

demonstram a importância do estudo do fluxo sanguíneo para compreender melhor a composição do FF, bem como o desenvolvimento oocitário.

O aumento das concentrações circulantes de LH está associado a um aumento na permeabilidade vascular dos capilares, bem como um edema nas camadas da teca (CLARK et al., 2004). A partir desse momento outros mecanismos estão envolvidos para que esse líquido possa ser acumulado no antro folicular. Dentre esses mecanismos estão principalmente as bombas de sódio/potássio e a ação de glicosaminoglicanos (GOSDEN et al., 1988). A composição bioquímica deste líquido é de esteróides e glicoproteínas sintetizadas na parede celular deste folículo. Durante a fase de crescimento folicular, com a formação do antro, o FF é caracterizado por uma grande quantidade de 17β -estradiol, entretanto, com a aproximação da ovulação, este líquido é marcado por elevadas taxas de P4. Dentre as funções do FF estão à maturação oocitária, a preparação para ovulação e transporte do oócito para o oviduto, a regulação das células da granulosa, o auxílio ao crescimento folicular e a estereoidogênese, além da preparação do folículo para a formação do CL e ativação de fatores estimulatórios e inibitórios que controlam o ciclo folicular (RENAVILLE et al., 2010).

A maturação oocitária se dá em dois estágios: um período de crescimento e um período de preparação nuclear e citoplasmática, aonde o oócito irá se preparar para o desenvolvimento final e a fertilização. O crescimento folicular começa a partir do recrutamento, onde o folículo primordial irá ser ativado. As células da granulosa atuam ativamente para o processo de crescimento oocitário, tendo em vista que estas células estão em contato direto com o oócito. Já quanto à preparação do oócito para a fertilização, o núcleo do oócito encontra-se quiescente na fase de diplóteno. Com a ação das gonadotrofinas no período pré-ovulatório, há inibição da produção do fator supressor da meiose, secretado pelas células da granulosa. Com isso retoma-se o processo de maturação nuclear, que faz parte de um dos processos da maturação oocitária (VAN HOECK et al., 2011)

2.3 ULTRASSONOGRAFIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

2.3.1 Aspiração folicular para a PIVE

A ultrassonografia, além de trazer benefícios para investigações patológicas e diagnósticos precoces, possibilitou a realização da aspiração folicular orientada por imagem.

Esta técnica tornou-se o procedimento de eleição para a coleta de oócitos objetivando a produção *in vitro* de embriões. A aspiração folicular é um procedimento não cirúrgico, e que pode ser realizada repetidas vezes em um mesmo animal. Desenvolvida em 1978 por Steptoe e Edwards (1978), a técnica de aspiração folicular utilizada para a recuperação de oócitos destinados à fertilização *in vitro*. Foi utilizada em bovinos pela primeira vez em 1987 (CALLESEN et al., 1987), sendo esta, uma adaptação da técnica já utilizada em humanos.

Várias adaptações foram feitas nos sistemas de aspiração ao longo dos anos, objetivando coletar o maior número de oócitos de boa qualidade. Entre os parâmetros estudados estavam o comprimento e calibre das agulhas (BALTUSSEN et al., 1992) e a pressão de vácuo exercida para a aspiração dos oócitos (FRY et al., 1997). Uma das mais importantes adaptações feitas foi a substituição da agulha de aspiração longa (de 50 a 80 cm de comprimento) por agulhas curtas e descartáveis, que são de fácil manipulação, tornando assim mais prático e seguro o processo de substituição de agulhas entre as aspirações de doadoras (BOLS et al., 1995).

2.3.2 Efeitos da OPU na fisiologia ovariana

Com o avanço na utilização da técnica de aspiração folicular, o uso repetido do procedimento e o início cada vez mais precoce no uso das doadoras, como o uso de novilhas pré púberes (BROGLIATTI e ADAMS, 1996), surge a discussão sobre a influência do procedimento na fisiologia ovariana, bem como sua ação deletéria ao órgão. Alguns estudos demonstram

que as aspirações podem causar efeitos negativos a função ovariana (BONI et al., 1997; PETYIM et al., 2007), enquanto outros estudos demonstram que mesmo passando por processos repetitivos de aspirações foliculares, a função ovariana, bem como os índices de gestação pós-aspiração são inalterados (BROWN et al., 1996; ALLER et al., 2010). A aspiração folicular foi também avaliada em diferentes épocas de gestação, e chegou-se a conclusão que este procedimento quando feito no primeiro trimestre de gestação não causa nenhum efeito deletério ao feto (MEINTJES et al., 1995). Viana (2003) observaram que repetitivas aspirações provocaram pouca irritação no fundo de saco vaginal, porém podem ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários, dependendo do número de sessões as quais as doadoras foram submetidas, e ao número médio de estruturas recuperadas por sessão de coleta. As principais alterações são a ocorrência de fibrose e perda de mobilidade dos ovários resultante de aderências. Na avaliação histológica pós-aspiração, os ovários apresentaram áreas com hemorragia e infiltrados de células inflamatórias, além de fibrose no estroma ovariano, associado a cicatrizes no trajeto da agulha. Estes também observaram que o número de COCs recuperados apresentaram uma relativa constância ao longo das sessões de punção. Este fato sugere que as lesões induzidas pelo procedimento não interferiram diretamente no processo de recrutamento folicular subsequente.

Estudos demonstram que o intervalo mínimo entre aspirações foliculares para o crescimento folicular se restabelecer é de três a quatro dias (BONI et al., 1997; GALLI et al., 2001). Em búfalos, houve redução do crescimento folicular de animais submetidos a longos períodos de aspirações duas vezes por semana, porém a diminuição no número de procedimentos de duas para uma vez por semana, melhorou a competência dos oócitos e a produção *In Vitro* dos embriões (NEGLIA et al., 2011b).

Os estudos diferem nos resultados, porém, de modo geral, subentende-se que aspirações repetitivas causam a longo prazo um efeito deletério a função e morfologia ovariana. Dependendo da repetibilidade do procedimento,

do intervalo entre eles e do número de perfurações causadas pela agulha. (VIANA, 2003)

2.3.3 Formação de Folículo Residual

A remoção do conteúdo folicular por aspiração transvaginal orientada por ultrassonografia pode não induzir a atresia e perda de função imediata dos mesmos, resultando na ocorrência de folículos residuais ou persistentes (VIANA et al., 2001; VIANA, 2003; DOREA et al., 2011). A presença de atividade esteroideogênica pós-aspiração nestas estruturas pode comprometer a eficiência da sincronização do crescimento folicular pela remoção do folículo dominante. Os mecanismos associados à manutenção ou não da atividade das células da parede folicular remanescente, contudo, não estão elucidados. Uma observação importante durante o processo de recuperação pós-aspiração da doadora foi registrada por DOREA et. al. 2011. Estes, trabalhando com vacas da raça Holandesa, observaram que 67% dos folículos aspirados em fase de divergência (8mm) tiveram seus lúmens preenchidos novamente, tornando-se folículos persistentes. Ao passo que 83% dos folículos dominantes, aspirados após a divergência (diâmetro ≥ 12 mm), persistiram após o processo. Estes dados indicam uma alta incidência de persistência folicular após a aspiração. A presença do folículo persistente e esteroideogenicamente ativo pode causar alterações e/ou inibição do desenvolvimento folicular da onda subsequente e comprometer os resultados da doadora em procedimentos posteriores. Estudos estão sendo feitos para elucidar a composição do líquido folicular do folículo residual (FR), indicando sua composição e um possível desequilíbrio na relação estrógeno- progesterona.

A alta incidência deste fenômeno após a aspiração pode estar ligado ao aumento nas concentrações plasmáticas de FSH (efeito rebote após a retirada do dominante) no período após a aspiração, levando a uma reativação do folículo, que permanece responsivo ao FSH circulante. No entanto, suspeita-se que com uma aplicação de Benzoato de estradiol (BE), para re-resincronizar a onda de crescimento folicular, no momento da aspiração do folículo dominante,

poderia reduzir a incidência do folículo persistente. Uma possível explicação seria um efeito inibitório do estrógeno sobre as concentrações de FSH. As elevadas concentrações de BE mantidas por até 48 h após a administração, poderiam inibir a elevação do FSH após a aspiração do folículo dominante, o que levaria a sua atresia (WILTBANK et al., 2000)

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J., BERISHA, B., OZAWA, T., SATO, K., SCHAMS, D., MIYAMOTO, A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroids hormones and prostaglandin secretion. *Biol. Reprod.* 61, 1419–1425, 1999.

ACOSTA TJ, YOSHIZAWA N, OHTANI M, MIYAMOTO A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol Reprod*, v 66, 651–658, 2002.

ACOSTA TJ, HAYASHI KG, OHTANI M, MIYAMOTO A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v.125, 759–767, 2003.

ACOSTA TJ, MIYAMOTO A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83:127-40, 2004.

ACOSTA TJ, HAYASHI KG, MATSUI M, MIYAMOTO A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J Reprod*, v 51, 273–280, 2005.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 72-80, 2008.

ALILA, H.W., HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod*, v.31, 1015–1025, 1984.

ALLER, J.F., MUCCI, N.C., KAISER, G.G., RIOS, G., CALLEJAS, S.S., ALBEIRO, R.H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci*, v.119, 1–8. 2010.

AROSH JA, BANU SK, KIMMINS S, CHAPDELAIN P, MACLAREN LA, FORTIER MA. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*, v.145, 5280–93. 2004.

BALTUSSEN RMWJ, VOS PLAM, PIETERSE MC, DE LOOS FAM, BEVERS MM, DIELEMAN SJ. Transvaginal ultrasound-guided follicle puncture in PMSG/PG-treated cows: a comparison between three puncture needles. *Theriogenology*, v.37:129–31, 1992.

BERGFELT DR, KULICK LJ, KOT K, GINTHER OJ. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. *Theriogenology*, v.54, 1191-206, 2000.

BISINOTTO R, IBIAPINA B, PONTES E, BERTAN C, SATRAPA R, BARROS C, BINELLI M. Luteal Function and Follicular Growth Following Follicular Aspiration During the Peri-Luteolysis Period in *Bos indicus* and Crossbred Cattle. *Reprod Domest Anim*, 2011.

BLOND L, BUCZINSKI S. Basis of ultrasound imaging and the main artifacts in bovine medicine. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v. 25 (3), 553-65. Review, 2009.

BOLS PEJ, VANDENHEEDE JMM, VAN SOOM A, DE KRUIF A. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v.43, 677–87, 1995.

BOLLWEIN H, MEYER HH, MAIERL J, WEBER F, BAUMGARTNER U, STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow. *Theriogenology*, v. 53, 1541–1552, 2000.

BOLLWEIN H, BAUMGARTNER U, STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology*, v.57, 2053–2061. , 2002.

BONI, R., ROELOFSEN, M.W., PITERSE, M., KOGUT, J., KRUIP, T.A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v. 48, 277–289, 1997.

BRANNSTROM M, ZACKRISSON U, HAGSTROM H, JOSEFSSON B, HELLBER P, GRANBERG S, COLLINS WP, BOURNE T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil. Steril*, v.69:435-442, 1998.

BROGLIATTI GM, ADAMS GP. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, v. 45, 1163-76, 1996.

BROWN, R.T., BROGLIATTI, G.M., ADAMS, G.P. Postpubertal fertility subsequent to repeated transvaginal oocytes in calves. *Theriogenology*, v.45, 358,1996.

CALLESEN H, GREVE T, CHRISTENSEN F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, v.27:217 (Abstract), 1987.

COMAN IM. Christian Andreas Doppler--the man and his legacy. *Eur J Echocardiogr*, V.6, 7-10, 2005.

CLARK LJ, IRVING-RODGERS HF, DHARMARAJAN AM, RODGERS RJ. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod*, v.71: 1071-1078, 2004.

COLLINS, W., JURKOVIC, D., BOURNE, T., KURJAK, A., CAMPBELL, S. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. *Hum. Reprod*, v. 6, 319–324, 1991.

CHUI, D.K.C.; PUGH, N.D.; WALKER, S.M.; GREGORY, L.; SHAW, R.W. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Human Reproduction*, v.12, 191-196, 1997.

CROWE, M.A., KELLY, P., DRIANCOURT, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin releasing hormone-immunized heifers. *Biol. Reprod*, v. 64, 368–374, 2001.

DICKEY RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update*, v. 3(5):467-503, 1997.

DOREA M.D., PALHAO, M.P., ARASHIRO, E.K.N., FERNANDES, C.A.C., LUZ, M.R., VIANA, J.H.M. Occurrence of persistent follicles after ultrasound-guided follicle aspiration in cattle: preliminary results. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Recife, PE, *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* v.35, n.2 Belo Horizonte: CBRA 2011.

DORRINGTON, J.H., MOON, Y.S., ARMSTRONG, D.T. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, v.97, 1328–1331, 1975.

FAO, The State of Food and Agriculture 2008, Chief, Publishing Policy and Support Branch, Office of Knowledge Exchange, Research and Extension
FAO, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy, 2008.

FITZGERALD DE, DRUMM JE. Non-invasive measurement of human fetal circulation using ultrasound: a new method. *Br Med J*, v.2, 1450-1, 1977.

FORDE, N., CARTER, F., FAIR, T., CROWE, M.A., EVANS, A.C.O., SPENCER, T.E., BAZER, F.W., MCBRIDE, R., BOLAND, M.P., O'GAORA, P., LONERGAN, P., ROCHE, J.F. Progesterone regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol. Reprod*, v. 81, 784–794, 2009.

FORDE N, BELTMAN ME, LONERGAN P, DISKIN M, ROCHE JF, CROWE MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* v. 124, 163-9, Review, 2010

FORTUNE, J.E., QUIRK, S.M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci.* v. 66 (Suppl. 2), 1–8, 1988.

FRY RC, NIALL EM, SIMPSON TL, SQUIRES TJ, REYNOLDS J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, v.47:977–87, 1997.

GALLI C, CROTTI G, NOTARI C, TURINI P, DUCHI R. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, 1341–1357, 2001.

GERHARD-HERMAN M, GARDIN JM, JAFF M, MOHLER E, ROMAN M, NAQVI TZ. Guidelines for noninvasive vascular laboratory testing: a report from the American Society of Echocardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr*, v.19, 955–972, 2006.

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

GINTHER OJ, KOT K, KULICK LJ, WILTBANK MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v. 48, 75–87, 1997.

GINTHER OJ. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 3, Cattle. Cross Plains, WI: *Equiservices Publishing*; 1998.

GINTHER OJ, BERGFELT DR, KULICK LJ, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod* v. 62, 920–927, 2000 a.

GINTHER OJ, BERGFELT DR, KULICK LJ, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*, v.63(2), 383-9, 2000 b.

GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, SIDDIQUI MA, BEG MA. Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biol Reprod.*, v.77(2), 202-8, 2007.

GOSDEN RG, HUNTER RH, TELFER E, TORRANCE C, BROWN N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil*, v.82, 813- 825, 1988.

GRIFFIN PG, GINTHER OJ. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J Anim Sci*, v.70(3), 953-72, 1992.

GUDMUNDSSON S, MARSAL K. Umbilical and uteroplacental blood flow velocity waveforms in pregnancies with fetal growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.27 (3):187-96, 1988.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 509p, 2004.

HERZOG K, BOLLWEIN H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reprod Domest Anim*, v.42 Suppl 2:51-8. Review. 2007

HILLIER, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod*, v. 9, 188–191, 1994.

IHNATSENKA B, BOEZAART AP. Ultrasound: Basic understanding and learning the language. *Int J Shoulder Surg*, v.4(3):55-62. 2010

AISWAL RS, SINGH J, ADAMS GP. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*, v.71(4):1244-51, 2004.

JANSON PO. Effects of luteinizing hormone on blood flow in the follicular rabbit ovary, as measured by radioactive microspheres. *Acta Endocrinology*, v.79 122–133, 1975.

KÄHN W, LEIDL W. Ultrasonic diagnosis (echography) in the gynecological examination of mares. *Tierarztl Prax*, v. 12, (2), 203-10, German. 1984.

KÄHN W, FRAUNHOLZ J, KASPAR B, PYCZAK T. Sonographic diagnosis of early pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard values and limitations. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v.1, 103(6), 206-11. Review. German. 1990

KAWASHIMA C, FUKIHARA S, MAEDA M, KANEKO E, MONTOYA CA, MATSUI M, SHIMIZU T, MATSUNAGA N, KIDA K, MIYAKE Y, SCHAMS D, MIYAMOTO A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction.*, v.133(1):155-63, 2007.

KNIGHT PG, SATCHELL L, GLISTER C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol*, 2011.

KO JCH, KASTELIC JP, DEL CAMPO MR, GINTHER OJ. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil*, v. 91, 511–519, 1991.

KULICK LJ, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v. 52, 913–921, 1999.

LAMOTHE, P., BOUSQUET, D., GUAY, P. Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *J. Reprod. Fertil*, v.50, 381–382, 1977.

LUO W, GUMEN A, HAUGHIAN JM, WILTBANK MC. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.84 (2), 369-78. 2010

MARSAL K. Doppler ultrasonography: techniques. In: Hanson A, Spencer JAD, Rodeck CH. *The Circulation*. University Press, Cambridge, pp. 296–332, 1993.

MATTIOLI, M., BARBONI, B., TURRIANI, M., GALEATI, G., ZANNONI, A., CASTELLANI, G., BERARDINELLI, P., SCAPOLO, P.A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod*, v.65, 1014–1019, 2001.

MATTON P, ADELAKOUN V, COUTURE Y AND DUFOUR JJ. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *Journal of Animal Science*, v. 52, 813-820,1981.

MATSUI M, MIYAMOTO A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *Vet J*, v.181(3), 232-40.Review, 2009.

MEINTJES M, BELLOW MS, BROUSSARD JR, PAUL JB, GODKE RA. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *J Anim Sci*, v.73(4), 967-74, 1995.

MIHM M, CROWE MA, KNIGHT PG, AUSTIN EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reprod Domest Anim*, v. 37(4), 191-200. Review, 2002.

MIYAMOTO A, SHIRASUNA K, WIJAYAGUNAWARDANE MP, WATANABE S, HAYASHI M, YAMAMOTO D, MATSUI M, ACOSTA TJ. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest Anim Endocrinol*,v. 29, 329–339 , 2005.

MIYAMOTO A, SHIRASUNA K, HAYASHI KG, KAMADA D, AWASHIMA C, KANEKO E, ACOSTA TJ, MATSUI M.A. Potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white.*J Reprod*, v.52(1), 153-60. Review, 2006.

MURDOCH, W., PETERSON, T., VAN KIRK, E., VINCENT, D., INSKEEP, E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod*, v. 35, 1187–1194, 1986.

MICEVYCH PE, KELLY MJ. Membrane Estrogen Receptor Regulation of Hypothalamic Function. *Neuroendocrinology*. 2012

NEGLIA G, VECCHIO D, RUSSO M, DI PALO R, PACELLI C, COMIN A, GASPARRINI B, CAMPANILE G. Efficacy of PGF(2 α) on Pre-ovulatory Follicle and Corpus Luteum Blood Flow. *Reprod Domest Anim*, 2011 a.

NEGLIA G, GASPARRINI B, VECCHIO D, BOCCIA L, VARRICCHIO E, DI PALO R, ZICARELLI L, CAMPANILE G. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. *Anim Reprod Sci*, v.123(3-4), 180-6, 2011 b.

NISWENDER GD, REIMERS TJ, DIEKMAN MA AND NETT TM. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biology of Reproduction*, v. 14, 64–81, 1976.

PALHAO MP, BEG MA, RODRIGUES MT, GINTHER OJ. Role of increased estradiol on altering the follicle diameters and gonadotropin concentrations that have been reported for double-ovulating heifers. *Anim Reprod Sci*, v. 122 (3-4):335-41, 2010.

PELLICER, A., PALUMBO, A., DECHERNEY, A., NAFTOLIN, F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science*, v. 240, 1660–1661, 1988.

PETYIM, S., BAGE, R., MADEJ, A., LARSSON, B. Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect cows animal well-being? *Reprod. Domest. Ani*, v. 42, 623–632, 2007.

RAJAKOSKI E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, end left–right variations. *Acta Endocrinologica*, v. 34, 1–68, 1960.

RAHE, C.H., OWENS, R.E., FLEEGER, J.L., NEWTON, H.J., HARMS, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, v.107, 498–503, 1980.

RENAVILLE B, BACCIU N, COMIN A, MOTTA M, POLI I, VANINI G, PRANDI A. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, v.45(1), 118-21, 2010.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis—a symposium in perspective. *Rev. Reprod*, v. 1, 19–27, 1996.

ROCH GJ, BUSBY ER, SHERWOOD NM. Evolution of GnRH: diving deeper. *Gen Comp Endocrinol*, v. 1, 171(1), 1-16. Review, 2010.

RODGERS RJ, IRVING-RODGERS HF. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, v. 139(2), 309-18, 2010.

SCHULTZ GS, WYSOCKI A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 17 153–162, 2009.

SIDDIQUI MA, ALMAMUN M, GINTHER OJ. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim Reprod Sci*, v. 113(1-4), 287-92, 2009.

SINGH, J., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v. 78, 371-399, 2003.

SPICER LJ, SCHREIBER NB, LAGALY DV, AAD PY, DOUTHIT LB, GRADO-AHUIR JA. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. *Anim Reprod Sci*, v. 124(1-2), 19-27, 2011.

STIRLING, D., MAGNESS, R., STONE, R., WATERMAN, M., SIMPSON, E. Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. *J. Biol. Chem*, v. 265, 5–8, 1990.

STEPTOE PC, EDWARDS RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, v. 12, 2, 366, 1978.

SUNDERLAND SJ, CROWE MA, BOLAND MP, ROCHE JF, IRELAND JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, v.101(3), 547-55, 1994.

SULTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, v.9, 35-48, 2003.

VAN HOECK V, STURMEY RG, BERMEJO-ALVAREZ P, RIZOS D, GUTIERREZ-ADAN A, LEESE HJ, BOLS PE, LEROY JL. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS One*, v. 6(8), 2011.

VARGA B, HORVATH E, FOLLY G AND STARK E Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. *Biology of Reproduction*, v. 32, 480–488, 1985.

VIANA, J. H. M. ; CAMARGO, L. S.A. ; FERREIRA, A. M. ; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular in vivo e fertilização in vitro no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 4, 477-478, 2001.

VIANA, J.H.M. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. *Pesq. Vet. Bras*, v.23, n.3, 119-124, 2003.

WILTBANK MC, FRICKE PM, SANGSRITAVONG S, SARTORI R, GINTHER OJ. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.80 n. 12, 2998-3007, 2000.

YAMADA, O. ABE, M., TAKEHANA, K., HIRAGA, T., HIRATSUKA. H. Microvasculature of mature bovine follicles and its changes with ovulation. *J. Reprod. Dev*, v. 40, 307–315, 1994.

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., AOKI, H., ODA, T., KOYAMA, N., NAGAI, A., AKIMOTO, Y., NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via AT2 receptor subtype. *Endocrinology*, v. 137, 1204–1211, 1996.

CAPÍTULO 1

PADRÃO DE VASCULAR DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar a avaliação subjetiva e objetiva da vascularização folicular e também determinar o padrão vascular do folículo pré-ovulatório de fêmeas bovinas. Foram utilizadas 60 vacas mestiças Holandês-Zebu que foram submetidas a protocolo de sincronização da ovulação, permitindo assim, que o folículo pré-ovulatório fosse avaliado em condições semelhantes entre os animais. Na primeira avaliação foi mensurada a medida do diâmetro de cada estrutura pré ovulatória e em seguida as imagens foram submetidas à avaliação subjetiva e objetiva da vascularização da parede do folículo. Foram avaliados 69 folículos pré-ovulatórios, sendo eles dominantes ou codominantes, tendo média de $12,0 \pm 2,7$ mm de diâmetro. Na avaliação subjetiva, encontrou-se uma maior distribuição nos escores 3 e 4, com 82,6% do total dos folículos pré-ovulatórios avaliados. A avaliação objetiva se mostrou semelhante à subjetiva ($p < 0,001$), obtendo 78% dos folículos com classificação 3 e 4 de vascularização. Concluiu-se que a técnica de avaliação do padrão vascular de folículos pré-ovulatórios por meio de ultrassonografia com Doppler colorido se mostrou eficiente e de variada aplicabilidade, demonstrando que a avaliação subjetiva, classificando a vascularização folicular por escore visual, é uma boa ferramenta para análise de vascularização, tendo eficiência semelhante à avaliação objetiva.

Palavras-chave: ultrassonografia Doppler, folículo pré-ovulatório, vascularização, bovinos

ABSTRACT

The present study aimed to compare the subjective and objective evaluation of follicular vascularization and also determine the vascular pattern of the preovulatory follicle of cows. A total of 60 crossbred Holstein-Zebu who underwent ovulation synchronization protocol, thereby allowing the preovulatory follicle to be evaluated under similar conditions. The first evaluation measured the diameter measurement of each pre-ovulatory structure and then the images were subjected to subjective and objective evaluation of vascularization of the follicle wall. 69 preovulatory follicles were evaluated, either dominant or codominant follicles, having average 12.0 ± 2.7 mm diameter. In the subjective evaluation, we found a greater distribution in scores 3 and 4, with 82.6% of the total pre-ovulatory follicles evaluated. Objective assessment was similar to the subjective ($p < 0.001$), obtaining 78% of the follicles rated class 3 and 4 of vascularization. It was concluded that the evaluation of the vascular pattern of pre-ovulatory follicles by color Doppler ultrasonography proved efficient and wide applicability, demonstrating that the subjective evaluation, classifying follicular vascularization by visual score, is a good tool for analysis of vascularization, with efficiency similar to the objective assessment.

Keywords: Doppler ultrasonography, preovulatory follicle, vascularization, bovine.

1 INTRODUÇÃO

O momento pré-ovulatório e periovulatório são marcados por mudanças significativas como a maturação meiótica do oócito, a ruptura folicular levando a ovulação e a mudança na esteroidogênese folicular de andrógeno/estradiol a progesterona (FORTUNE et al. 2009). No período periovulatório ocorre aumento no fluxo sanguíneo na parede folicular e crescimento do folículo, resultando em aumento significativo da área de vascularização, aumentando o sinal Doppler (ACOSTA et al., 2003). Este aumento pode ser analisado e mensurado com a avaliação da imagem da ultrassonografia com Doppler colorido, que possibilita a visualização e mensuração do fluxo sanguíneo em associação com a visualização do modo B em diferentes momentos do crescimento folicular (COLLINS et al ., 1991; BRANNSTROM et al., 1998; ACOSTA et al., 2002).

O período pré ovulatório é regulado por vários hormônios e reações específicas para que o folículo possa crescer ao ponto de sofrer sua maturação final e conseguir ovular, liberando o oócito para que este possa sofrer a fertilização. Dentre os hormônios envolvidos neste processo o LH é o mais importante, porém existe ainda ação da $PGF_{2\alpha}$ (ALGIRE et al., 1992), estrógeno (SÉBERT et al. 2010), FSH e progesterona (FORTUNE et al. 2009).

A importância do estudo da vascularização no momento pré-ovulatório deve-se à relativa influência do fluxo sanguíneo com a qualidade do oócito, determinação da atividade no ambiente intrafolicular e principalmente por sua influência sobre os resultados da fertilização *in vitro* (HUEY et al. 1999; BRANNSTROM et al. 1998).

O objetivo deste estudo foi comparar duas técnicas de avaliação do padrão vascular, além de determinar um padrão para o folículo pré-ovulatório com o auxílio da ultrassonografia Doppler. O estabelecimento da vascularização do folículo pré-ovulatório, serviu como um padrão para os demais capítulos onde houve a investigação da vascularização no folículo residual e a tentativa de estabelecimento de uma estratégia para tratamento deste fenômeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso de Animais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite) (Anexo 1).

2.1 LOCALIZAÇÃO, PERÍODO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O experimento foi conduzido no mês de agosto de 2011. A parte de campo do experimento foi realizada no Campo Experimental Dr. José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite localizado no município de Coronel Pacheco, Região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais (435 metros de altitude). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região onde foi conduzido o estudo é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual entre 18,0°C a 23,0°C e precipitação pluviométrica anual de 1.581mm³. Os dados climatológicos durante o período experimental são apresentados na tabela a seguir, tendo sido obtidos na estação meteorológica da Embrapa Gado de Leite, localizada no Campo Experimental

O período experimental foi desenvolvido durante o período seco do ano, com grande estiagem e pouca precipitação de chuva.

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental Dr. José Henrique Buschi (média ± desvio padrão)

Dados climatológicos	
Temperatura máxima (°C)	29,2 ± 3,1
Temperatura mínima (°C)	13,7 ± 2,3
Umidade relativa do ar (%)	73,0 ± 5,0
Precipitação (mm ³)	40,0

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 60 vacas mestiças Holandês-Zebu em lactação. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação (pastagem de *Brachiaria decumbens*), seguindo o manejo nutricional e sanitário adotado pela Embrapa Gado de Leite. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Os animais estavam em lactação, produzindo em média $12,4 \pm 6,7$ litros de leite por dia.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização da ovulação, para que o folículo pré-ovulatório fosse avaliado em condições semelhantes entre os animais experimentais.

O protocolo consistiu de uma aplicação no D0 de 2,0 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP), e inserção de implante de progesterona (Sincrogest, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP). No D0 também foi aplicado 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP) para prevenir a interferência de eventuais corpos lúteos na dinâmica vascular ovariana. Sendo assim, no D9 do protocolo, 57 animais apresentaram folículos pré-ovulatórios e foram submetidos a avaliações por ultrassonografia, usando a função Doppler colorido para mensuração do fluxo sanguíneo.

2.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Para as avaliações ultrassonográficas, cada animal foi contido em um brete apropriado, as fezes presentes no reto foram retiradas e o transdutor do aparelho de ultrassom inserido e posicionado manualmente pelo mesmo operador. Os exames ultrassonográficos foram realizados com um aparelho portátil de ultrassom equipado com função Doppler colorido e com um transdutor linear retal de 7,5 MHz (MyLab 30- Esaote, Gênova, Itália). Dentre

as possíveis configurações do aparelho, foram selecionados previamente alguns padrões de ganhos de cor e frequência. A frequência utilizada foi de 7,5 MHz, com um ganho de cor de 70%. Foi utilizado uma frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,7 KHz, que refere-se ao número de pulsos por unidade de tempo. Neste caso foi utilizado um aparelho de onda pulsada, com uma profundidade de avaliação de seis centímetros. A barra de velocidades (Velocity Range) utilizada foi de +0.05 a -0.05 m/s. Todas as avaliações foram realizadas utilizando-se a mesma frequência e padrão de ganhos e cor. Após a localização do ovário, seguindo a ordem de avaliação (primeiro ovário direito, depois o esquerdo) foi feita a identificação do animal e do ovário avaliado em modo B na tela do ultrassom. Após a identificação dos ovários, a imagem do folículo pré-ovulatório foi gravada com o recurso Doppler colorido ativada, permitindo assim a avaliação do fluxo sanguíneo e estabelecimento do padrão vascular no momento pré-ovulatório por meio de dispositivo do próprio equipamento.

2.5 ANÁLISE DAS IMAGENS

Com os vídeos gravados, os arquivos foram avaliados posteriormente em ambiente escuro para facilitar a visualização das imagens. Após efetuar uma cópia dos arquivos, os vídeos foram avaliados individualmente. Foi realizada a medida do diâmetro de cada estrutura pré ovulatória. Para tal, foram mensuradas duas medidas de diâmetro (vertical e horizontal) no momento de maior área, o diâmetro médio de cada folículo foi a média destes dois valores.

Tendo as avaliações de diâmetro realizadas, as imagens foram submetidas à avaliação subjetiva da vascularização na parede do folículo. Um mesmo avaliador, observou todas as imagens e classificou-as subjetivamente quanto à quantidade de vascularização, por modo de escore. Esta classificação teve auxílio de quatro imagens selecionadas previamente para estipular um padrão para cada classificação (Figura 1). Estas imagens foram tomadas como base de classificação para as demais avaliadas. O escore variou de 1 a 4, onde 1

seria uma vascularização intensa, 2 seria boa, 3, mediana, 4, discreta, conforme demonstrado na figura 1.

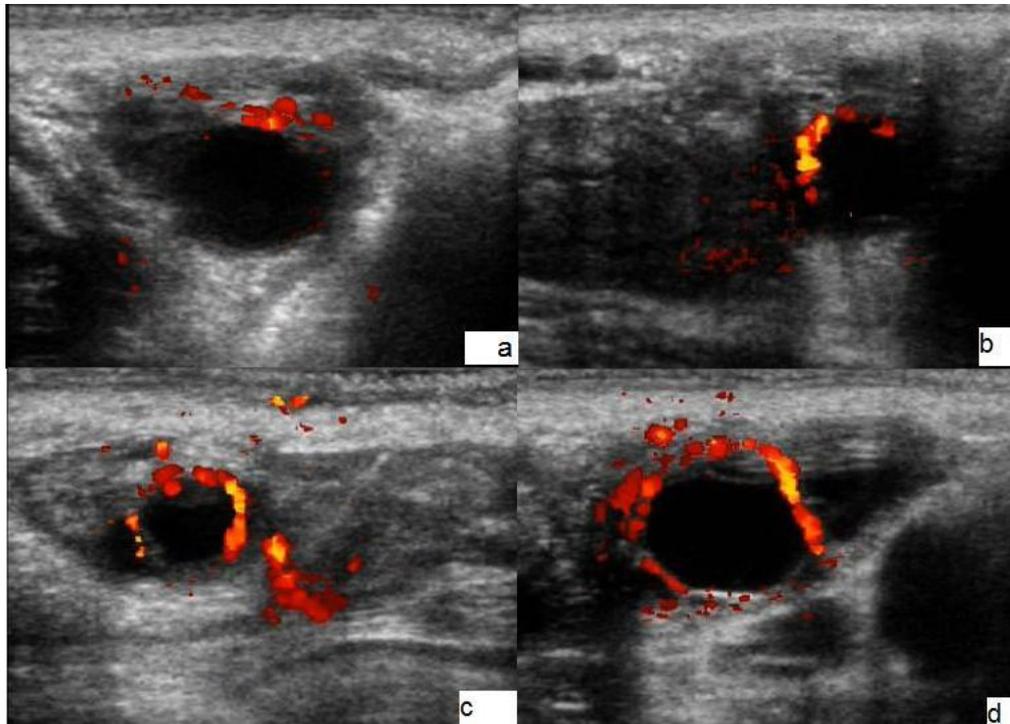


Figura 1. Demonstração dos folículos tomados como parâmetro para classificação de escore para vascularização. a. escore 4; b. escore 3 ;c. escore 2; d. escore 1.

Para avaliação objetiva, foi necessário mensurar a área interna do folículo e posteriormente a área externa do mesmo folículo, para tal foi utilizada uma função do próprio aparelho que possibilita a determinação da área. Assim, ao realizar a subtração destas áreas, interna e externa, obteve-se a área da parede do folículo. Para o cálculo da área de vascularização utilizou-se o cursor para se delimitar a região de maior vascularização na parede do folículo. Estes procedimentos possibilitaram a determinação da área da parede do folículo e a área de vascularização. A razão entre as duas áreas determinou o percentual de vascularização na área da parede do folículo. Este resultado foi classificado em quartis para que pudesse ser comparado com o resultado da avaliação subjetiva. Na figura a seguir é exemplificada a metodologia de cálculo das áreas.

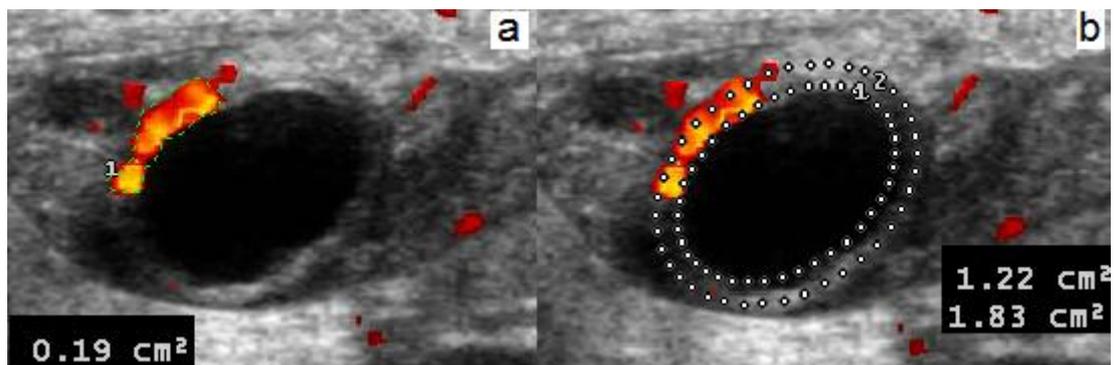


Figura 2. Demonstração do cálculo da área de vascularização e da área da parede. A imagem (a) demonstra a medida da área da vascularização demarcada pela linha pontilhada em verde. Na imagem (b) foi medida a área da parede interna e a área da parede externa, a subtração dessas duas medidas informa a área total da parede do folículo.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados referentes aos parâmetros diâmetro foliculares e área de vascularização da parede folicular foram submetidos à análise estatística descritiva, para definição do comportamento das variáveis (média, desvio-padrão, coeficiente de variação). Para a avaliação da abordagem utilizada na quantificação da vascularização da parede folicular, a consistência entre os resultados das mensurações objetiva e subjetiva foi analisada pela representação gráfica da distribuição dos dados (Box-Plot), e pelos testes de Goodman-Kruskal, Kendall tau-b e Spearman's rho. Foi considerado, para definição de significância, um valor de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Software Minitab, versão 16.

3. RESULTADOS

No total foram avaliados 69 folículos pré-ovulatórios, sendo eles dominantes ou codominantes, tendo média de $12,1 \pm 2,8$ mm de diâmetro no momento da avaliação.

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstraram que a avaliação dos folículos se encontram com uma maior distribuição nos escores 3 e 4. Isto representa 75,4% do total de folículos avaliados. Este escore representa uma vascularização mediana a discreta. Os resultados das avaliações objetivas foram avaliados através de histograma (Figura 3) podendo assim obter melhor visualização da distribuição dos resultados segundo o percentual de vascularização.

Tabela 2. Avaliação subjetiva da área de vascularização dos folículos pré-ovulatórios por meio de ultrassonografia com Doppler colorido em vacas mestiças Holandês-Zebu

Escore de Avaliação	Percentagem de animais
1 - Intensa	4,34% (3/69)
2 - Boa	20,29% (14/69)
3 - Mediana	44,92% (31/69)
4 - Discreta	30,43% (21/69)

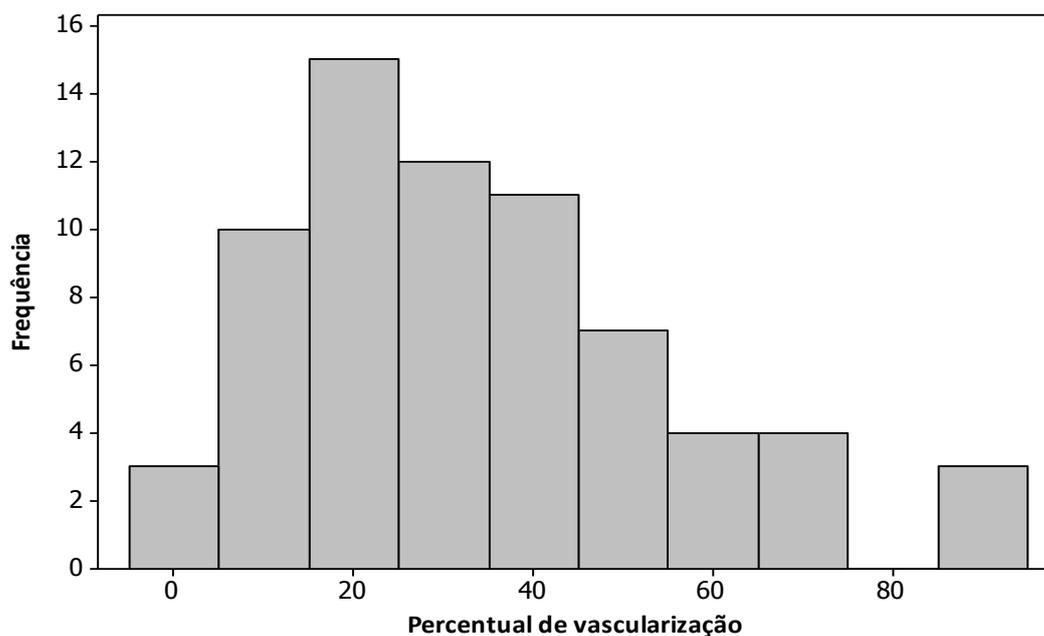


Figura 3. Relação entre percentual de vascularização e ocorrência das avaliações objetivas no modo de histograma.

Após a avaliação subjetiva foi necessário avaliar os resultados de uma forma objetiva, podendo assim obter valores comparáveis com a avaliação visual de escore de vascularização. Esta avaliação objetiva teve como principal ferramenta a avaliação de área (cm²) das imagens dos folículos capturados. O resultado da razão entre a área da parede e a área de vascularização forneceu uma porcentagem de vascularização de cada folículo, que posteriormente foi possível distribuir em um sistema de escore conforme o método subjetivo, dando a possibilidade de comparação entre os dois. A avaliação objetiva se mostrou semelhante à subjetiva ($p < 0,001$ – Figura 4), obtendo 78% dos folículos com classificação 3 e 4 com vascularização de 49,9 a 0% ou mediana a fraca. Este resultado demonstrou que as avaliações objetivas e subjetivas são semelhantes e tendem a apresentar resultados semelhantes (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação objetiva da área de vascularização do folículo pré-ovulatórios de vacas mestiças Holandês-Zebú

Quartis	Percentagem de vascularização	Número de folículos	Área da parede do folículo (cm ²)	Área de vascularização do folículo (cm ²)
1	100 - 75	3	0,43 ± 0,25	0,39 ± 0,22
2	74,9 - 50	12	0,39 ± 0,09	0,24 ± 0,06
3	49,9 - 25	24	0,48 ± 0,17	0,17 ± 0,06
4	24,9 - 0	30	0,54 ± 0,17	0,09 ± 0,07

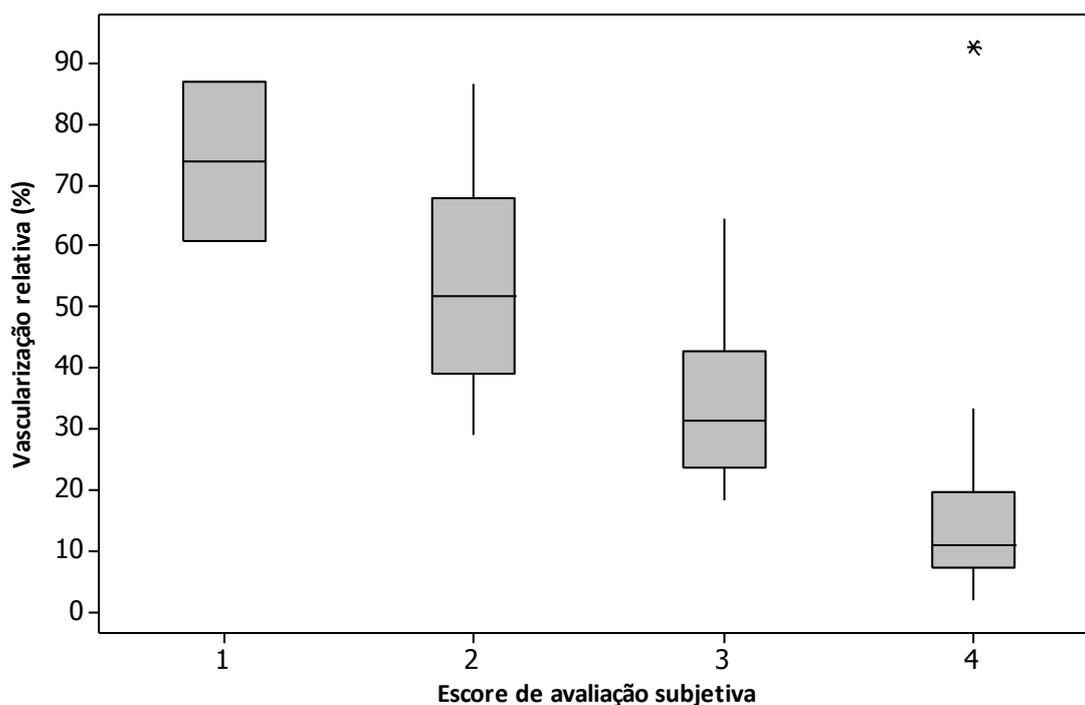


Figura 4. O gráfico em box plot demonstra o resultado da comparação entre a avaliação subjetiva com a objetiva da vascularização do folículo pré-ovulatório.

Foram considerados três tipos de testes para variáveis categóricas ordinais (Goodman e Kruskal's Gamma - 0,85; Kendall's Tau-b -0,65 e Spearman's rho - 0,69). Todas estas medidas assumem valores entre -1 e 1 e,

de uma forma geral, sugerem a existência de uma associação “forte” entre as variáveis, pois quanto mais próximo do valor 1 indica uma associação “perfeita”. Entretanto, indica ausência de associação, ou “independência” entre as variáveis, quando seu valor é nulo. Tendo valores encontrados superiores a 0,60 em todos três os testes utilizados, temos a indicação que existe boa associação/concordância entre as avaliações objetiva e subjetiva.

A representação gráfica (Figura 5) demonstra a equiparidade entre as duas formas de avaliação. As avaliações, feita de forma objetiva, através da razão entre as áreas ou mesmo subjetivamente, através de classificação por score, fornecem informações semelhantes sobre a vascularização folicular.

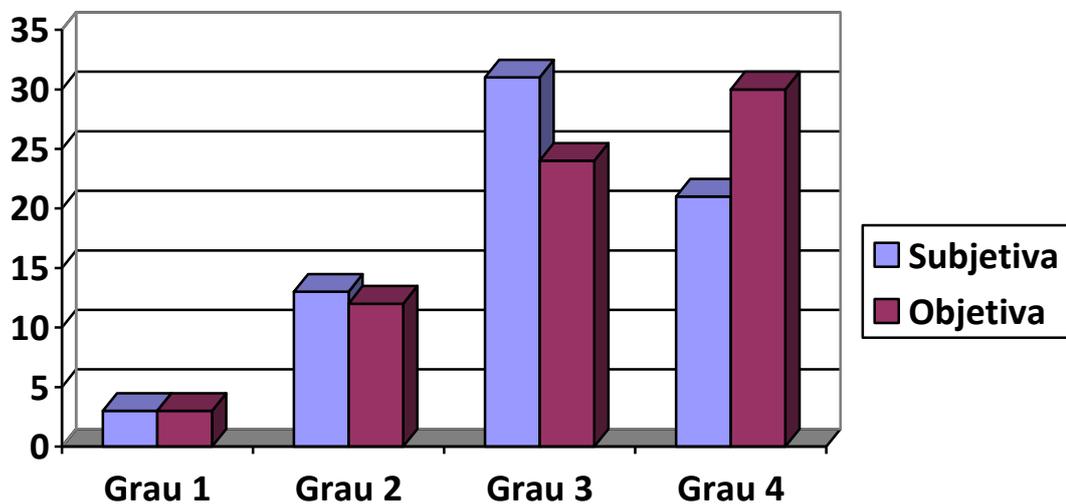


Figura 5. Gráfico de distribuição de vascularização dos folículos pré-ovulatórios nas avaliações objetivas e subjetivas ($p>0,05$)

Dentre os folículos avaliados de forma objetiva o folículo que apresentou maior porcentagem de vascularização foi de 93% de vascularização na sua parede. Já o folículo que apresentava menor porcentagem foi de 2% de vascularização.

4. DISCUSSÃO

Foi demonstrado em estudos que a angiogênese e desenvolvimento da vascularização pode influenciar a maturação do folículo pré-ovulatório e influenciar na seleção do folículo dominante (REDMER e REYNOLDS, 1996; AUGUSTIN et al. , 2001), assim como a fraca vascularização dos folículos, sendo ela insuficiente para suprir suas necessidades, podendo ser o ponto inicial de desencadeamento da atresia folicular (WATSON AND ALZI'ABI, 2002; FERANIL et al., 2005). Sendo assim, este estudo é de grande importância para definição da qualidade e quantidade de vascularização de um folículo pré-ovulatório, sendo eles, com potenciais diferentes dependendo do resultado encontrado.

Para discutir sobre a vascularização folicular tendo influência sobre a taxa reprodutiva subsequente é importante resaltar que a mudança na vascularização pode ter influência não só com a taxa de oxigênio e a composição do FF. A vascularização pode ter influência direta sobre a atividade das células do cumulus, e sendo a atuação destas células diretamente no ambiente intrafolicular, contribuem para o desenvolvimento oocitário, e são de grande importância (GREGORY e LEESE, 1996).

Este estudo possibilitou avaliar o padrão vascular dos folículos pré-ovulatórios. Quando avaliado no modo de histograma, a partir das informações obtidas pela avaliação objetiva, é possível observar que a distribuição dos resultados está principalmente entre 20 e 40% de vascularização, sendo esse o padrão encontrado para folículos pré-ovulatórios. A partir desses resultados é possível observar que a distribuição feita por quartis, na avaliação subjetiva, que foi realizada em intervalos de 25%, ou seja, de 0 a 25%; de 25 a 50%; 50 a 75% e 75 a 100% de vascularização, deveria em outros estudos ser realizada de acordo com os resultados obtidos em relação ao histograma, ou seja, a partir da distribuição encontrada estabelecer os quartis. Isso se torna necessário, pois, utilizando-se de quartis previamente estabelecidos, como no caso deste estudo, esta distribuição nos leva a interpretar os resultados como sendo uma vascularização moderada ou discreta. Entretanto, considerando

intervalos de acordo com os resultados obtidos no histograma, é possível interpretar o resultado como sendo um padrão encontrado desses folículos.

Os resultados de diâmetro folicular para animais mestiços Holandês-Gir condizem com o encontrado por Borges (2001), o qual encontrou uma média de 12,0 mm para folículos pré-ovulatórios de raças mestiças *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Quando comparada as duas formas de avaliação, é possível notar que a tendência de classificação é semelhante (Figura 4), porém observa-se uma variação de vascularização dentro de um mesmo tipo de classificação. Provavelmente isso ocorreu, porque o alvo principal da avaliação foi à área (cm²), não levando em conta a intensidade de cores apresentada no aparelho que varia de acordo com a intensidade do fluxo sanguíneo. É este o motivo pelo qual avaliações subjetivas darem aos folículos analisados um pouco mais de crédito na avaliação quando comparados ao modo objetivo.

Dentro da comparação entre vascularização objetiva e vascularização subjetiva (Figura 3) é possível notar a presença de um animal diferenciado na avaliação. Ele é representado na figura pelo símbolo (*) que na estatística, é classificado como *outlier*, ou valor atípico, que é uma observação que apresenta um grande afastamento das demais da série. Esta observação foi caracterizada na avaliação objetiva como sendo de vascularização grau 4 e quando analisada sobre um ponto de vista subjetivo foi avaliada grau 1 de vascularização. Após revisão foi possível constatar que esta observação encontrada ocorreu, devido a um erro de medição na avaliação objetiva, entretanto não influencia no resultado geral do estudo, já que apenas uma avaliação fugiu da tendência encontrada.

Quanto aos resultados observados quando da comparação entre as duas formas de avaliação, observa-se que os métodos de avaliação possuem um nível de associação que permite existir correlação entre as duas formas de avaliação.

Ocorreu uma grande diferença entre o folículo de maior vascularização para o de menor, essa diferença pode não apenas significar uma questão quantitativa, mas sabe-se que existe uma relação direta com o potencial futuro

do oócito proveniente destes folículos, já que um maior fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório está associado com o estabelecimento da gestação em humanos (BORINI et al. 2001) e bovinos (SIDDIQUI et al., 2009).

Chui et al. (1997) observaram que folículos com baixa vascularização estão associados a resultados desfavoráveis quanto a fertilidade, enquanto somente os folículos que apresentavam vascularização intensa ou boa (classificação 1 ou 2) conseguiam realmente estabelecer uma gestação.

Segundo Acosta (2007) a importância da classificação do folículo dominante segundo vascularização é que apenas folículos dominantes com alta vascularidade podem ter uma chance de alcançar a maturação final e adquirir a capacidade ovulatória. No presente experimento apenas uma avaliação foi realizada no período pré-ovulatório. Talvez a realização de avaliações seriadas, assim como feita por Siddiqui et al., (2009) possa fornecer informações mais completas do aumento ou diminuição da vascularização periférica e assim estabelecer a dominância ou atresia, já que estudos indicam que no período periovulatório encontra-se aumento da vascularização intrafolicular (CAMPBELL et al., 1993). Assim como encontrado por Chui et al. (1997), este estudo confirmou que a ultrassonografia Doppler possibilita a visualização da vascularização folicular, sendo este procedimento indispensável para a classificação de folículos pré-ovulatórios por meio da avaliação do fluxo sanguíneo.

Em humanos, Kim et al. (2004) constaram que a vascularização folicular estava associada a gestação no processo de fertilização *in vitro*. Seus resultados sugerem que a avaliação da vascularização pode ser um prognóstico mais efetivo da gestação do que a avaliação no líquido folicular da presença do fator de crescimento endotelial vascular ou do óxido nítrico.

A utilização de Índices como de Resistência e Pulsatilidade podem ser utilizados para melhorar a pré avaliação dos folículos já que estes índices podem ser bons indicadores de qualidade de oócito (DU et al., 2006). Entretanto, em reprodução animal esses índices ainda são pouco estudados e por isso o conhecimento e a aplicabilidade deles não é eficiente.

A ferramenta de avaliação de escore de vascularização pode servir como um meio de investigação e análise da condição do rebanho, já que é possível classificar de forma objetiva ou subjetiva, através de escore, a vascularização dos folículos ovulatórios. Em outros estudos estes resultados podem ser associados com a condição corporal dos animais e posterior taxas de gestação, podendo assim, predizer ou indicar uma tendência de resultado favorável ou não a gestação antes mesmo da fecundação.

5. CONCLUSÃO

Os folículos pré-ovulatórios das vacas mestiças Holandês-Zebú caracterizaram-se em sua maioria por vascularização mediana a discreta.

A avaliação subjetiva a partir da classificação visual da vascularização possibilitou a classificação dos folículos pré-ovulatórios segundo sua vascularização e é uma boa ferramenta para análise, tendo eficiência semelhante à avaliação objetiva.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA TJ, YOSHIZAWA N, OHTANI M, MIYAMOTO A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol Reprod*, v.66, 651–658, 2002.
- ACOSTA TJ, HAYASHI KG, OHTANI M, MIYAMOTO A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v. 125, 759–767, 2003.
- ACOSTA TJ. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev* v. 53 (1):39-44. Review. 2007
- ADAMIAK SJ, MACKIE K, WATT RG, WEBB R, SINCLAIR KD. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod*. 2005
- ALGIRE J, SRIKANDAKUMAR A, GUILBAULT L, DOWNEY B. Preovulatory changes in follicular prostaglandin and their role in ovulation in cattle. *Can J Vet Res*, 56, 67–69, 1992.
- AUGUSTIN H. G., IRUELA-ARISPE M. L., ROGERS P. A. W., SMITH S. K. Vascular morphogenesis in the ovary. *Vascular Morphogenesis in the Female Reproductive System*, ed. Birkhauser , 109–130, 2001.
- BORGES, Á.M. et al. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.53, n.5, 595-604, 2001.
- BORINI A, MACCOLINI A, TALLARINI A, BONU MA, SCIAJNO R, FLAMIGNI C. Perifollicular vascularity and its relationship with oocyte maturity and IVF outcome. *Ann N Y Acad Sci*, v. 943:64-7, 2001.
- BRANNSTROM M, ZACKRISSON U, HAGSTROM H, JOSEFSSON B, HELLBER P, GRANBERG S, COLLINS WP, BOURNE T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil. Steril*, v. 69, 435-442, 1998.
- CAMPBELL, S., BOURNE, T.H., WATERSTONE, J. ET AL. Transvaginal colour blood flow of the periovulatory follicle. *Fertil. Steril.*, v. 60, 433–438, 1993.
- CHUI, D.K.C.; PUGH, N.D.; WALKER, S.M.; GREGORY, L.; SHAW, R.W. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Human Reproduction*, v.12, 191-196, 1997.

COLLINS, W., JURKOVIC, D., BOURNE, T., KURJAK, A., CAMPBELL, S. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. *Hum. Reprod*, v. 6, 319–324, 1991.

DU B, TAKAHASHI K, ISHIDA GM, NAKAHARA K, SAITO H, KURACHI H. Usefulness of intraovarian artery pulsatility and resistance indices measurement on the day of follicle aspiration for the assessment of oocyte quality. *Fertil Steril*, v.85(2):366-70, 2006.

FERANIL, J. B., N. ISOBE, AND T. NAKAO. Immunolocalization of von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor during follicular atresia in the swamp buffalo ovary. *J. Reprod*, v. 51:419–426. 2005.

FORTUNE JE, WILLIS EL, BRIDGES PJ, YANG CS. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod*, v. 6 (1), 60-71, 2009.

GREGORY, L., LEESE H.J. Determinants of oocyte and pre-implantation embryo quality: metabolic requirements and the potential role of cumulus cells. *J. Br. Fertil. Soc.*, v. 1, 96–102, 1996.

HUEY S, ABUHAMAD A, BARROSO G, HSUMI, KOLM P, MAYER J ANDOEHNINGER S. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental, 1999.

KIM KH, OH DS, JEONG JH, SHIN BS, JOO BS, LEE KS. Follicular blood flow is a better predictor of the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer than follicular fluid vascular endothelial growth factor and nitric oxide concentrations. *Fertil Steril*, v. 82 (3):586-92, 2004.

REDMER, D. A.; L. P. REYNOLDS. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod*, v.1:182–192,1996.

SÉBERT ME, LOMET D, SAÏD SB, MONGET P, BRIANT C, SCARAMUZZI RJ, CARATY A. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol*, v. 38 (4), 289-98, 2010.

SIDDIQUI MA, ALMAMUN M, GINTHER OJ. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim Reprod Sci*, v.1, 13(1-4):287-92, 2009.

WATSON, E. D., ALZI'ABI M. O.. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. *Reproduction*, v. 124:227–234, 2002.

CAPÍTULO 2

PADRÃO VASCULAR DE FOLÍCULOS APÓS-ASPIRAÇÃO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi utilizar a tecnologia Doppler colorido para avaliar a vascularização do folículo residual pós-aspiração e conseguir estipular padrões de vascularização destes folículos. Neste experimento foram utilizadas vacas Holandês-Zebu (n=10), lactantes, cíclicas, com idade média de $4,33 \pm 1,83$ anos, com escore da condição corporal médio de $2,4 \pm 0,36$ e com graus de sangue diversos. O crescimento folicular foi sincronizado, para que o folículo dominante da onda subsequente (diâmetro médio de $12,9 \pm 0,8\text{mm}$) pudesse ser aspirado. O fluxo sanguíneo (FS) foi monitorado pela função Doppler colorido imediatamente antes e a cada 12h após a aspiração, durante três dias, para que o fluxo pudesse ser mensurado em cada folículo pelo cálculo da razão entre a área máxima do sinal Doppler e a área da parede folicular medida na secção central do folículo. Todos os folículos aspirados (n=10) apresentaram persistência com formação inicial de coágulo na cavidade folicular 12h pós-aspiração, seguida de retração e formação de cavidade preenchida por fluido de aspecto anecóico, semelhante ao antro de folículos não aspirados. Somente um animal (10%) apresentou redução (87,0%) no fluxo sanguíneo imediatamente após a aspiração. Os demais animais apresentaram após-aspiração, um pico de vascularização 48 horas depois da aspiração, seguindo de uma diminuição desta vascularização após este momento ($p < 0,01$). Foi possível a determinação de uma equação de regressão ($y = -1,16x^2 + 11,326x + 16,26$; $R^2 = 0,764$), demonstrando assim o comportamento do desenvolvimento do folículo residual. A utilização da tecnologia Doppler permitiu a avaliação da vascularização do folículo residual, possibilitando o acompanhamento e desenvolvimento de um padrão vascular. Concluiu-se que a aspiração folicular afeta o padrão vascular da parede, levando a um aumento transitório do fluxo sanguíneo.

Palavras-chave: folículo residual, vascularização, aspiração folicular, vacas

ABSTRACT

The aim of this study was to use color Doppler technology to assess vascularity of residual follicle after aspiration to stipulate patterns of vascularization of this follicles. In this experiment were used Holstein-Zebu cows ($n = 10$), lactating, cyclic, with a mean age of 4.33 ± 1.83 years and mean body condition score of 2.4 ± 0.36 and different blood degrees. The follicular growth was synchronized so that the dominant follicle of the subsequent wave (average diameter of 12.9 ± 0.8 mm) could be aspirated. Blood flow (BF) was monitored by color Doppler function immediately before and every 12 hours after intake for three days so that the flow could be measured in each follicle by calculating the ratio between the maximum area of the Doppler signal and the wall area measured in the center section the follicle. All follicles aspirates ($n = 10$) were persistent with the initial formation of clot in the cavity 12h post-follicular aspiration, followed by retraction and formation of fluid-filled cavity anechoic appearance similar to non-antral follicles aspirated. Only one animal (10%) showed a decrease (87.0%) in blood flow immediately after aspiration. The remaining animals showed after aspiration, a peak of vascularization 48 hours after aspiration, followed by a decrease in the vascularization after this time ($p < 0.01$). It was possible to determine a regression equation ($y = -1.16x + x^2 + 11.326x + 16.26$, $R^2 = 0.764$), demonstrating the behavior of the residual follicle development. The use of Doppler technology allowed the assessment of vascularity in residual follicle, allowing the monitoring and development of a vascular pattern. It was concluded that follicular aspiration affects the vascular pattern of the wall, leading to transient increase in blood flow.

Keywords: residual follicles, vascularization, follicular aspiration, cows

1 INTRODUÇÃO

A aspiração folicular para recuperação de complexos cumulus-oócito (COCs) é uma técnica bem difundida, com sua utilização se tornando cada vez mais presente no Brasil quando comparado a outros países. O Brasil se destaca no cenário internacional, sendo responsável por cerca de 83% de todos os embriões produzidos *in vitro* no ano de 2009 no mundo (STROUD e BO, 2011).

A aspiração folicular pode não eliminar totalmente o folículo aspirado, pois pode ocorrer a repleção de líquido intrafolicular e posterior permanência nos ovários. O folículo residual já foi descrito (VIANA et al., 2001; VIANA, 2003; HAYASHI et al., 2006; DOREA et al., 2011) e pode chegar a ser encontrado em até 80% dos folículos aspirados. Como não é descrita a composição destes folículos nem mesmo sua influência sobre as ondas subsequentes, existe a necessidade de investigação desse fenômeno, no caso especificamente da vascularização destes folículos para determinar um padrão vascular e desenvolver estudos para discussão sobre sua composição e comportamento. Assim, pode-se chegar ao conhecimento mais apurado da ação desses folículos, se têm influência ou não na dinâmica folicular, possibilitando criar futuras ferramentas de controle, com a utilização sequencial de doadoras para a produção de embriões, que podem ter sua onda folicular comprometida pela presença do folículo residual.

O objetivo deste estudo foi utilizar a tecnologia Doppler colorido para avaliar a vascularização do folículo residual pós-aspiração e assim determinar os padrões de vascularização destes folículos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso de Animais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite (CNPGL) (Anexo 1).

2.1 LOCALIZAÇÃO, PERÍODO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O experimento foi conduzido no período de março a abril de 2011. O experimento foi realizado no Campo Experimental Dr. José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite no município de Coronel Pacheco, Região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais (435 metros de altitude). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região onde foi conduzido o estudo é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual entre 18,0°C a 23,0°C e precipitação pluviométrica anual de 1.581mm³. Os dados climatológicos durante o período experimental são apresentados na tabela a seguir, tendo sido obtidos na estação meteorológica da Embrapa Gado de Leite, localizada no Campo Experimental

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental de Coronel Pacheco (média \pm desvio padrão).

Dados climatológicos	
Temperatura máxima (°C)	30,8 \pm 1,1
Temperatura mínima (°C)	21,1 \pm 1,7
Umidade relativa do ar (%)	76,0 \pm 6,0
Precipitação (mm ³)	123,7

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação (pastagem de *Brachiaria decumbens*), seguindo o manejo nutricional e sanitário adotado pela Embrapa Gado de Leite. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Neste experimento foram utilizadas vacas Holandês-Zebu (n=10), lactantes, cíclicas, com idade média de $4,3 \pm 1,8$ anos e com escore da condição corporal médio de $2,4 \pm 0,3$, em uma escala de 1 a 5 (LOWMAN, 1976). Dos animais utilizados, a distribuição dos graus de sangue foram as seguintes: quatro animais 7/8, cinco animais foram 3/4 HZ e um animal Holandês puro de origem.

2.3 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO

Os animais submetidos ao protocolo de sincronização folicular. O crescimento folicular foi sincronizado (D0) pela aplicação de 1,0 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP), e inserção de implante de progesterona natural (Sincrogest, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP). No D0 também foi aplicado 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP) para prevenir a interferência de eventuais corpos lúteos na avaliação da dinâmica vascular ovariana. O folículo dominante da onda subsequente (diâmetro médio de $12,9 \pm 0,8$ mm) foi aspirado.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As avaliações ultrassonográficas iniciaram no D0, onde os ovários foram avaliados a cada 24 horas em modo B para acompanhamento da dinâmica folicular até o momento da aspiração folicular. Os dados obtidos nestas avaliações foram transferidos para uma ficha de acompanhamento (Anexo 2). A partir desta avaliação foi possível identificar o folículo dominante da onda de

crescimento, que foi aspirado quando atingido aproximadamente 12 mm. Após a aspiração, o monitoramento foi efetuado imediatamente após a mesma e a cada 12 h por um período de 72h, onde foram feitos vídeos em modo B e com a função Doppler colorido ligada para identificar o folículo residual (FR) bem como a vascularização nele existente. Os FRs foram localizados por meio do acompanhamento da dinâmica folicular e da sua distinção dos demais folículos pela presença de um coágulo no seu interior.

2.5 ULTRASSONOGRAFIA - DINÂMICA FOLICULAR

O fluxo sanguíneo (FS) foi monitorado pela função Doppler colorido imediatamente antes e a cada 12h após a realização da aspiração, durante três dias consecutivos. O fluxo foi mensurado em cada folículo pelo cálculo da razão entre a área máxima do sinal Doppler e a área da parede folicular medida na secção central do folículo.

O ultrassom utilizado neste estudo foi um aparelho portátil de ultrassom equipado com função Doppler colorido e com um transdutor linear retal de 7,5 MHz (MyLab 30 - Esaote, Gênova, Itália). Dentre as configurações do aparelho, foram selecionados previamente alguns padrões de ganhos de cor e frequência. A frequência utilizada foi de 7,5 MHz, com um ganho de cor de 70%. Foi utilizada uma frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,7 KHz, que refere-se ao número de pulsos por unidade de tempo. Utilizou-se uma profundidade de avaliação de 6,0 centímetros (cm). A barra de velocidades (Velocity Range) utilizada foi de +0.05 a -0.05 m/s. Todas as avaliações foram realizadas utilizando-se a mesma frequência e padrão de ganhos e cor e padrões ultrassonográficos.

2.6 PUNÇÃO FOLICULAR

Foi realizada a punção do folículo dominante quando o folículo apresentou um diâmetro médio de 12,0 mm. Foram utilizados os procedimentos convencionais de OPU, conforme Seneda et al., 2001 e Seneda

et al. 2003. O aparelho de ultrassom (MyLab 30- Esaote, Gênova, Itália) teve o seu transdutor vaginal microconvexo adaptado a uma guia de punção folicular para ser utilizado na aspiração. Uma agulha descartável esterilizada 20G, com 7,0 cm de comprimento e com bisel invertido, foi conectada a um tubo flexível de silicone que terminava dentro de microtubo posicionado no interior de um tubo Falcon de 50 mL. A coleta deste líquido foi efetuada diretamente do sistema de aspiração, para o microtubo estéril posicionado dentro de um tubo tipo Falcon (Figura 1). A diferença de pressão (65-70 mmHg) foi aplicada utilizando-se uma bomba de vácuo para aspiração do líquido folicular.



Figura 1. Sistema adaptado para coleta do líquido folicular, com microtubo posicionado dentro do tubo Falcon.

2.7 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens foram avaliadas no laboratório posteriormente a captura das mesmas. Os vídeos em modo B foram analisados e os folículos residuais identificados. Após esta identificação e realização de cópia dos arquivos, os vídeos dos animais selecionados foram analisados individualmente em modo Doppler colorido. Na primeira avaliação foi realizada a medida do diâmetro de cada estrutura pré-ovulatória, para tal foram mensuradas duas medidas de

diâmetro (vertical e horizontal) no momento de maior área, para que a partir da média destas fosse fornecido o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório, já que alguns folículos não apresentavam formato regular.

Após as avaliações de diâmetros efetuadas, a seguir foi realizada a avaliação da área da parede dos folículos, para tal, foram avaliados a área interna e posteriormente a área externa do folículo. Ao realizar a subtração das áreas, obteve-se a área da parede do folículo. Sendo assim, foi necessário utilizar a mesma função de cálculo de área para mensurar a área do sinal de vascularização emitido na imagem no ponto de maior vascularização. Tendo então a área da parede do folículo e a área de vascularização da parede do folículo, foi possível efetuar a razão entre as áreas e obter o percentual de vascularização da parede do folículo (Figura 2).

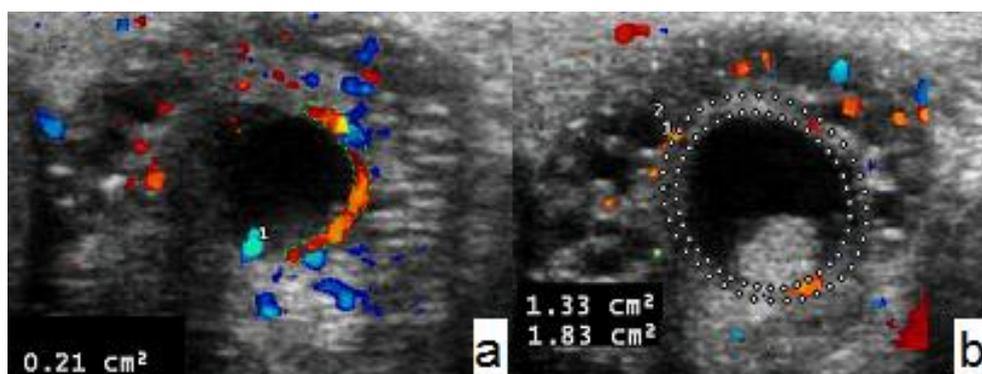


Figura 2. Cálculo da área de vascularização da parede do folículo residual (a) demarcada pela linha pontilhada em verde e da área interna e externa do folículo residual (b), através de uma função do próprio aparelho, onde a subtração dessas duas medidas informa a área da parede do folículo.

2.8 ANÁLISES DE CONCENTRAÇÃO ESTRÓGENO E PROGESTERONA

As análises da concentração de progesterona e estrógeno do líquido folicular dos folículos pré-aspiração foram realizadas pela técnica de radioimensaio utilizando-se kits comerciais de fase sólida com rI^{125} (Coat-a-Count[®], Medlab), no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual

Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP campus de Botucatu – SP (matrícula CNEN 14542).

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros diâmetro folicular, concentração intrafolicular de estradiol e progesterona e a relação estrógeno:progesterona foram submetidos a análise estatística descritiva, para definição do comportamento das variáveis (média, desvio-padrão, coeficiente de variação). O efeito da variável tempo pós-aspiração sobre a vascularização da parede folicular foi determinado por análise de regressão, sendo a curva de regressão ajustada para um modelo quadrático. Foi considerado, para definição de significância, um valor de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizada com o auxílio do Software SAEG 9.0 (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil hormonal dos folículos no momento da primeira aspiração demonstrou folículos com concentrações de estradiol acima das concentrações de progesterona (Tabela 2). As concentrações de estradiol se apresentaram cerca de 17 vezes maior que as concentrações médias de progesterona. O resultado das dosagens hormonais condizem com os encontrados por Moallem et al. (2011) para concentração de estradiol e progesterona. Os folículos foram avaliados quanto à concentração de hormônios antes das aspirações para a confirmação de que eles estavam realmente ativos, pois se apresentassem relação estradiol/progesterona baixas, poderia indicar que o folículo aspirado estivesse em processo de atresia, o que poderia comprometer a padronização do experimento (NISHIMOTO et al. 2009). Foram assim considerados todos os folículos ativos e incluídos em uma mesma categoria, apresentando assim a mesma capacidade de formar o folículo residual.

Tabela 2. Características dos folículos pré aspiração em função do perfil esteroidogênico

Diâmetro	Concentrações foliculares de estradiol	Concentrações foliculares de progesterona	Relação E2:P4
12,9 ± 0,8	600,7 ± 393,8	51,9 ± 35,2	16,9 ± 16,8

Durante o acompanhamento da dinâmica folicular, 60% (6/10) dos animais chegaram ao momento de aspiração sete dias após o início do protocolo. Os demais animais, 40% (4/10) apenas chegaram ao momento de aspiração no décimo dia após início do protocolo. A diferença encontrada na taxa de crescimento dos folículos durante o protocolo pré-aspiração, é citada por diferentes autores (CIPRIANO et al. 2011; CUERVO-ARANGO et al., 2011).

Os folículos residuais foram descritos previamente por VIANA et al. (2001), VIANA (2003), HAYASHI et al. (2006) e DOREA et al. (2011), entretanto, suas características e comportamento ainda não estão completamente elucidados. São poucos os estudos que descrevem este fenômeno, ou mesmo seus padrões e valores. Pouco se sabe sobre a composição de seu fluido, sua origem e sua influência sobre as ondas foliculares seguintes.

Todos os folículos aspirados (n=10) apresentaram folículos residuais, caracterizada pela formação inicial de coágulo na cavidade folicular 12h pós-aspiração, seguida de retração e formação de cavidade preenchida por fluido de aspecto anecóico, semelhante ao antro de folículos não aspirados. Esta observação é superior ao relatado por Dórea et al. (2011), que encontraram 80% de persistência para folículos aspirados com 12 mm. O acompanhamento das imagens pós-aspiração possibilitou a descrição da morfologia do folículo residual (Figura 3). A formação do folículo residual com replecionamento de líquido no interior do folículo ocorreu 12 horas após a aspiração. A imagem de

ultrassom do FR é de fácil distinção por não condizer com nenhum outro folículo em crescimento no acompanhamento da dinâmica folicular.

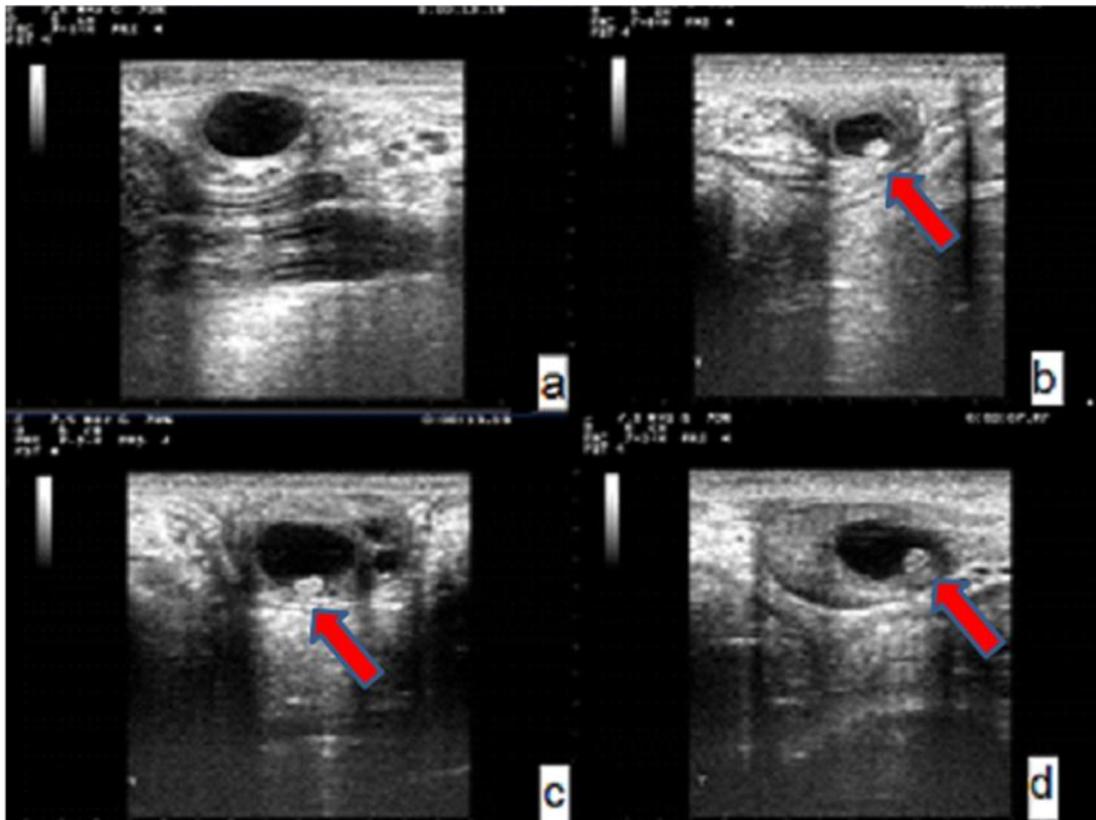


Figura 3. Sequência de imagens representando na ordem, (a) folículo dominante no momento da aspiração, (b) 24h, (c) 48h e (d) 72h pós-aspiração. É possível observar a presença de um coágulo hiperecótico indicados pelas setas no interior do folículo nas imagens pós-aspiração.

A aspiração folicular é de grande utilização comercial, e em programas de aspiração intensificados, qualquer tipo de alteração nas ondas subsequentes a aspiração podem prejudicar o processo de aspiração. Carlin et al., (1999) demonstraram que a aspiração folicular a longo prazo, cerca de 16 semanas, afeta o perfil de progesterona, LH e FSH, alterando assim a dinâmica ovariana desses animais. A aspiração folicular também é utilizada para a ablação do folículo dominante (BERGFELT et al., 1994; CAVALIERI et al., 2001; BERGFELT et al. 2007) utilizando-se deste procedimento para sincronização da onda folicular. A remoção do folículo dominante é uma

abordagem estratégica de sincronização da onda folicular, onde a remoção do FD determina o surgimento de onda de FSH para sincronização de uma nova onda folicular (BURKE et al., 2003). Entretanto esse FSH benéfico para a sincronização da onda folicular pode ser o responsável pela manutenção e ativação do FR.

Quando foi avaliada a vascularização folicular, somente um animal (10% - 1/10) apresentou redução (87,0%) no fluxo sanguíneo (FS) imediatamente após a aspiração. Os demais animais apresentaram um aumento da vascularização 48 horas após o processo da aspiração, seguindo de uma diminuição desta ($P < 0,01$).

A utilização do ultrassom com função Doppler possibilitou a visualização da vascularização durante todo o processo pós-aspiração (Figura 5). Esta tecnologia permitiu o cálculo da área de vascularização em cada momento de avaliação. Foi utilizado um padrão de cor semelhante ao usado com color flow, já que a direção do fluxo sanguíneo não alterava nenhum padrão de avaliação. Neste experimento não foi avaliado a velocidade e intensidade do fluxo sanguíneo. Foi utilizado para avaliação apenas a área encontrada na imagem de maior vascularização.



Figura 4. Representação da vascularização do folículo aspirado 24h, 48h e 72h, demonstrando claramente o aumento, atingindo seu potencial máximo por volta de 48h, seguido de uma diminuição da vascularização.

Na tabela 3 são apresentados os dados referentes à avaliação da vascularização dos folículos residuais em diferentes momentos após a aspiração do folículo dominante.

Tabela 3. Médias e desvio padrão da área da parede do folículo residual, área de vascularização do folículo residual e percentagem da vascularização nos diferentes tempos pós punção folicular

Tempo pós-punção folicular/Respostas	Área da parede do folículo residual (cm²)	Área de vacularização do folículo residual (cm²)	Percentagem da vascularização (%)
0h	0,49±0,11	0,12±0,07	26,08±11,59
12h	0,37±0,14	0,13±0,05	33,91±10,36
24h	0,39±0,16	0,13±0,07	34,41±12,18
36h	0,40±0,20	0,15±0,10	41,95±24,74
48h	0,40±0,15	0,19±0,12	48,96±22,20
60h	0,38±0,15	0,14±0,07	41,13±19,85
72h	0,47±0,17	0,17±0,10	45,59±33,53

Os resultados encontrados na tabela 3, para folículos residuais, condizem com o padrão encontrado em folículos pré-ovulatórios no capítulo 1, onde a maioria dos folículos apresentavam vascularização entre 25 a 49,9%. Isto indica que o folículo pós-aspiração mantém uma vascularização semelhante ao encontrado pré-aspiração.

Quando avaliado o fluxo sanguíneo em função do tempo pós-aspiração, foi possível identificar um aumento transitório significativo ($p < 0,05$) na vascularização apresentando efeito quadrático em função do tempo ($y = -1,16x^2 + 11,326x + 16,26$; $R^2 = 0,764$ – Figura 4), com aumento até 48h e redução posterior.

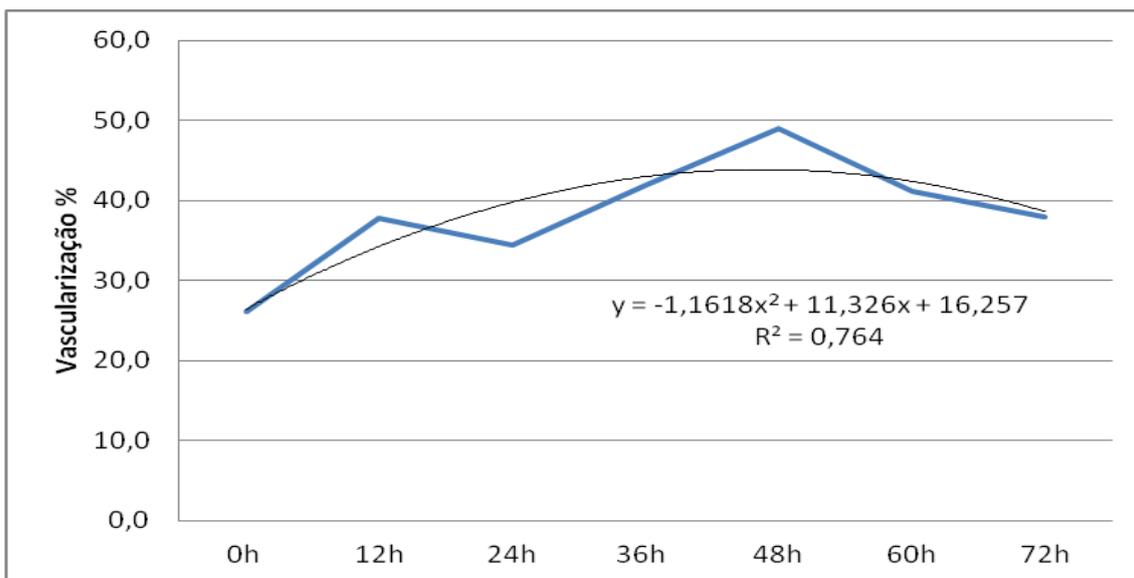


Figura 5. Relação do percentual de vascularização em função do tempo de avaliação. O percentual foi considerado pela razão entre a área de vascularização e a parede do folículo (cm^2) ($P < 0,05$).

A ação inflamatória poderia indiretamente contribuir para a manutenção da atividade esteroideogênica nas células remanescentes da parede folicular, podendo ter influência no crescimento deste folículo, já que em 50% dos casos (5/10) o diâmetro do FR em algum momento do processo de acompanhamento ultrapassou o diâmetro do folículo aspirado (Anexo 7).

O processo de aspiração folicular é um processo traumático. A penetração de uma agulha dentro do folículo para aspiração do oócito e líquido folicular pode causar alterações na morfologia e consistência do ovário (VIANA, 2003). A penetração desta agulha pode causar um processo inflamatório na parede folicular aumentando a vascularização na periferia deste folículo facilitando a cicatrização e recuperação da área afetada, pois, a parede do folículo sofre uma inflamação semelhante à degeneração da matriz extracelular, desencadeando uma reação inflamatória local (CAVENDER e MURDOCH, 1988; ESPEY 1994; SMITH et al., 1994). Schams e Berisha (2004) descrevem o processo inflamatório da formação do corpo lúteo com angiogênese e ação de agentes vasoativos. Possivelmente o processo

inflamatório causado na parede folicular após a punção seja semelhante ao da formação de um corpo lúteo, com ação de agentes vasoativos e angiogênicos. Isso explicaria o comportamento da vascularização no folículo residual encontrado no presente estudo.

Após a aspiração folicular, com a retirada do líquido folicular e a aspiração do oócito, ao folículo penetrado restam somente células residuais da granulosa e da teca em seu interior. As células da granulosa no momento pré-antral tem como finalidade principalmente promover um ambiente em que o oócito cresça e se desenvolva. Para isso essas células estão envolvidas com a regulação e produção de fatores de crescimento e proteínas necessárias para o desenvolvimento do oócito. Já no momento antral, essas mesmas células modificam sua atuação visando o amadurecimento do oócito, promovendo maturação nuclear através de estimulação pela esteroidogênese (DRIANCOURT e THUEL, 1998). É importante ressaltar que logo após a aspiração folicular as células da granulosa estão em processo de esteroidogênese, e o fato de não haver um pico de LH promovendo a luteinização das células remanescentes no interior do folículo, impede a diferenciação dessas células, o que as faria produzir progesterona (HANSEL et al., 1991). A partir dessa informação podemos supor que os resultados encontrados no presente estudo podem ter a influência das células não luteinizadas, promovendo assim continuidade da sua atividade, iniciando uma nova secreção de estradiol e assim permitindo o crescimento do folículo residual depois de aspirado.

Com a aspiração do folículo dominante, a ação do FSH sobre a onda subsequente inicia-se imediatamente, com um pico na secreção de FSH aproximadamente 29 horas após a ablação do dominante (BURKE et al., 2003). Assim, essa concentração de FSH após a realização do punção folicular pode estar ligado a manutenção do FR no presente estudo e principalmente com a ativação e permanência de atividade esteroidogênica.

Quando da ocorrência do ovário cístico em vacas, o crescimento folicular é parado em decorrência da liberação de andrógenos e outros esteróides pelo cisto folicular (PETER, 2004). Utilizando esta mesma idéia é

possível entender a aspiração folicular e conseqüente formação do folículo residual e produção de esteróides, como um procedimento que atua negativamente no crescimento folicular subseqüente.

4. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a aspiração folicular não interrompe a vascularização da parede folicular remanescente, podendo ocorrer um aumento transitório do fluxo sanguíneo do folículo residual subseqüente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v.42(6):895-907, 1994.

BERGFELT DR, MEIRA C, FLEURY JJ, FLEURY PD, DELL'AQUA JA, ADAMS GP. Ovulation synchronization following commercial application of ultrasound-guided follicle ablation during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v.68(8):1183-91, 2007.

BURKE CR, MUSSARD ML, GASSER CL, GRUM DE, DAY ML. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*. v. 1;60(4):647-58, 2003.

CAVALIERI J, FARIN PW, KINDER JE, VAN CAMP SD, WHITACRE MD, WASHBURN SP, BRITTJH. Ovarian follicular development following administration of progesterone or aspiration of ovarian follicles in Holstein cows. *Theriogenology*, v.55 (3):805-21, 2001.

CAVENDER JL, MURDOCH WJ. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* v.39, p. 989-997, 1988.

CARLIN SK, GARST AS, TARRAF CG, BAILEY TL, MCGILLIARD ML, GIBBONS JR, AHMADZADEH A, GWAZDAUSKAS FC. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. *Theriogenology*, v.51(8):1489-503,1999.

CIPRIANO RS, CARVALHO BA, MARANGONI NR, NOGUEIRA GP. LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci.*, v.127(1-2):16-22. 2011

CUERVO-ARANGO J, GARCÍA-ROSELLÓ E, GARCÍA-MUÑOZ A, VALLDECABRES-TORRES X, MARTÍNEZ-ROS P, GONZÁLEZ-BULNES A. The effect of a single high dose of PGF₂ administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. *Theriogenology*, v.76 (9):1736-43. 2011

DOREA M.D., PALHAO, M.P., ARASHIRO, E.K.N., FERNANDES, C.A.C., LUZ, M.R., VIANA, J.H.M. Occurrence of persistent follicles after ultrasound-guided follicle aspiration in cattle: preliminary results. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Recife, PE, *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* v.35, n.2 Belo Horizonte: CBRA 2011.

DRIANCOURT MA, THUEL B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod Nutr Dev*, v. 38(4):345-62, 1998.

ESPEY LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* v.50, p. 233-238, 1994.

HANSEL W, ALILA HW, DOWD JP, MILVAE RA. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J Reprod Fertil Suppl*, v 43, 77-89,1991.

HAYASHI KG, MATSUI M, ACOSTA TJ, KIDA K, MIYAMOTO A. Effect of the dominant follicle aspiration before or after luteinizing hormone surge on the corpus luteum formation in the cow. *J Reprod*,v.52(1):129-35,2006..

MOALLEM U, BLANCK R, LEHRER H, LIVSHITZ L, ZACHUT M, ARIELI A. Effects of high dietary crude protein on the characteristics of preovulatory follicles in dairy heifers. *J Dairy Sci*. v. 94 (2) :785-92. 2011.

NISHIMOTO H, HAMANO S, HILL GA, MIYAMOTO A, TETSUKA M. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. *J Reprod Dev*, v.55(2):219-24. 2009

PETER AT. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim*, v.39 (1):1-7, 2004.

SCHAMS D, BERISHA B. Regulation of corpus luteum function in cattle, anoverview. *Reprod Domest Anim*. V. 39(4):241-51. Review. 2004

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, OLIVEIRA JA, VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*, v. 3, (1-2), 37-43, 2001.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, ANDRADE ER, BINELLI M, OLIVEIRA JA, NASCIMENTO AB. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59(5-6), 1435-40, 2003.

SMITH MF, MCINTUSH EW, SMITH GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*, v.72, p. 1857-1872.2. 1994

STROUD B.; BO G. Estatísticas Mundiais de 2009 para Transferência Embrionária em Animais Domésticos de Fazenda .Resumo do Relatório da Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS) Reunião Anual da Sociedade Brasileira de

Tecnologia de Embriões. 25, 2011, Cumbuco, CE, Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) v.39, n. 1 Cumbuco: SBTE 2011.

VIANA, J. H. M. ; CAMARGO, L. S.A. ; FERREIRA, A. M. ; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular in vivo e fertilização in vitro no estado de Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 4, p. 477-478, 2001.

VIANA, JHM. et al. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. Pesq. Vet. Bras, v.23,3, 119-124, 2003.

CAPÍTULO 3

BENZOATO DE ESTRADIOL COMO ESTRATÉGIA PARA CONTROLE DE FOLÍCULOS RESIDUAIS RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação do benzoato de estradiol no momento da aspiração como ferramenta para limitar a formação do folículo residual. Neste experimento foram utilizadas 22 vacas da raça Holandesa e vacas mestiças Holandês-Zebu. Os animais apresentavam idade média de $5,45 \pm 2,22$ anos e número de partos médio de $2,32 \pm 1,49$. Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização da ovulação, sendo o folículo dominante da nova onda foi aspirado ao atingir aproximadamente 12 mm de diâmetro. No momento da aspiração folicular os animais foram divididos em dois grupos experimentais, a saber: G_{BE} animais receberam uma dose de 2 mg de benzoato de estradiol e o G_{salina} 2 mL de solução salina via intra muscular. Dos 22 animais aspirados, 18 (81%) apresentaram folículos residuais (FR), e destes, apenas 11 (61%) folículos foram aspirados 72h após a primeira aspiração. Os folículos dominantes foram aspirados com diâmetro médio de $12,72 \pm 2,33$ mm e os residuais aspirados apresentaram diâmetro médio de $10,73 \pm 3,36$ mm. O benzoato não interferiu no aparecimento do FR, entretanto, quanto a taxa de crescimento dos folículos residuais, foi possível notar que a taxa de crescimento do folículo residual no G_{salina} foi maior que o G_{BE} ($p < 0,001$). O perfil hormonal dos folículos residuais apresentou diferença entre os grupos, sendo o G_{BE} apresentou uma concentração folicular de estradiol menor ($p < 0,05$) do que o G_{salina} , diminuindo a relação estrógeno/progesterona. Conclui-se que a aplicação de benzoato de estradiol no momento da aspiração não impediu a formação do folículo residual. Entretanto, o benzoato de estradiol diminuiu o diâmetro do folículo residual ($p < 0,001$) e também a atividade estrogênica no FR dos animais tratados, demonstrando ter utilidade para controle da esteroidogênese pós-aspiração em folículos residuais em processo de luteinização.

Palavras-chave: folículo residual, benzoato de estradiol, estradiol, progesterona, vacas

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the application of estradiol benzoate at the time of aspiration as a tool to limit the formation of residual follicles. In this experiment we used 22 Holstein cows and crossbred Holstein-Zebu. The animals had a mean age of 5.45 ± 2.22 years and mean parity of 2.32 ± 1.49 . The animals were subjected to a protocol for synchronization of ovulation, the dominant follicle of the new wave was aspirated when reached approximately 12 mm in diameter. At the time of follicle aspiration animals were divided into two groups, namely: GBE animals received a dose of 2 mg estradiol benzoate and Gsalina 2 mL of saline intra muscular. Of the 22 animals aspirated, 18 (81%) had residual follicles (FR), and of these, only 11 (61%) follicles were aspirated 72 hours after the first aspiration. The dominant follicles were aspirated with an average diameter of 12.72 ± 2.33 mm and the residual aspirated showed average diameter of 10.73 ± 3.36 mm. The benzoate did not affect the appearance of the RF, however, as the rate of growth of residual follicles, it was noticeable that the rate of growth of follicles in Gsalina residual was greater than the GBE ($p < 0.001$). The hormonal profile of residual follicles differ between groups, with GBE showed a follicular estradiol concentrations lower ($p < 0.05$) than Gsalina, decreasing the relation between estrogen / progesterone. It is concluded that the application of estradiol benzoate at the time of aspiration has not prevented the formation of residual follicle. However, estradiol benzoate decreased residual follicle diameter ($p < 0.001$) and also in FR estrogenic activity of treated animals, demonstrating have utility for control of steroidogenesis in residual follicles after aspiration in the process of luteinization.

Keywords: residual follicle, estradiol benzoate, estradiol, progesterone, cows

1 INTRODUÇÃO

A permanência de estruturas esteroidogenicamente ativas no ovário após o procedimento de aspiração foi descritas por alguns autores (VIANA et al., 2001; VIANA, 2003; HAYASHI et al., 2006; DOREA et al., 2011). Estas foram denominadas de folículos residuais, e estudos ainda não indicaram se podem ou não comprometer o desenvolvimento folicular normal. Esse comprometimento pode ser por alteração ou inibição do crescimento folicular posterior. Estando a doadora em um processo constante de aspiração, para coleta de complexos COCs para fertilização *in vitro*, a permanência desta estrutura poderia determinar uma falha ou atraso na onda de crescimento do folículo seguinte, prejudicando assim um programa de produção *in vitro* de embriões.

Atualmente, estudos que avaliam a relação E2/P4 estão sendo realizados para definir a composição e a influência desse folículo residual nas ondas subsequentes, e a relação estrógeno- progesterona (VIANA et al., 2001). A alta incidência dessas estruturas (80%) após a aspiração do folículo dominante (DOREA, 2011), é de grande importância que se tenha o conhecimento de sua influência e principalmente uma forma de controle para evitar sua formação. Uma das hipóteses da ocorrência desta persistência seria uma ação do FSH nos folículos aspirados promovendo um efeito rebote de suplementação, logo após a queda abrupta do estrógeno do folículo aspirado. Esse aumento repentino nas concentrações de FSH pós-aspiração, poderia levar a uma reativação do folículo aspirado, formando o folículo residual. Mantendo a manutenção de elevadas concentrações circulantes de estrógeno por até 48h, permitiria a inibição da liberação do FSH, evitando assim a formação do folículo residual e levando-o a atresia e crescimento normal da onda folicular subsequente.

O objetivo deste estudo foi avaliar a administração do benzoato de estradiol no momento da aspiração para evitar a formação do folículo residual.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso de Animais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite (CNPGL) (Anexo 1).

2.1 PERÍODO EXPERIMENTAL, LOCALIZAÇÃO, E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O experimento foi conduzido no mês de outubro de 2011 no Campo Experimental Dr. José Henrique Bruschi (CEJHB) localizado no município de Coronel Pacheco, Região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais (435 metros de altitude). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região onde foi conduzido o estudo é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual entre 18,0°C a 23,0°C e precipitação pluviométrica anual de 1.581mm³. Os dados climatológicos durante o período experimental são apresentados na tabela a seguir, tendo sido obtidos na estação meteorológica da Embrapa Gado de Leite, localizada no Campo Experimental.

Tabela 1. Dados climatológicos obtidos durante o período experimental no Campo Experimental de Coronel Pacheco (média \pm desvio padrão).

Dados climatológicos	
Temperatura máxima (°C)	26,1 \pm 2,8
Temperatura mínima (°C)	16,2 \pm 2,8
Umidade relativa do ar (%)	79,0 \pm 10,0
Precipitação (mm ³)	7,8 \pm 13,5

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação (pastagem de *Brachiaria decumbens*), seguindo o manejo nutricional e sanitário adotado pela Embrapa Gado de Leite. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Neste experimento foram utilizados 22 animais mestiços Holandês-Zebu e da raça Holandesa . Desses animais seis eram de grau de sangue 7/8 HZ, dois animais 3/4, um animal 8/9, um animal 7/9, um animal 5/7, um animal 1/2 e 10 animais da raça Holandesa puro por cruza e puro de origem. Os animais apresentavam idade média de $5,4 \pm 2,2$ anos e número parto médio de $2,3 \pm 1,5$.

2.3 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO

Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização da ovulação, isto para que o folículo dominante de todos os animais pudesse estar em condições semelhantes no momento da aspiração folicular. Este protocolo consistiu em uma aplicação no D0 de 2,0 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP), e inserção de implante de progesterona (Sincrogest, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP) por oito dias. No D0 foi aplicado também 0,5 mg de clorprostenol sódico (Sincrocio, OuroFino Agronegócio, Cravinhos, SP) para prevenir a interferência de eventuais corpos lúteos na avaliação da dinâmica vascular ovariana. Após o oitavo dia os implantes foram retirados e os animais posteriormente submetidos a aspiração folicular.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O folículo dominante da onda foi aspirado ao atingir aproximadamente 12 mm de diâmetro. No momento da aspiração folicular os animais foram divididos em dois grupos experimentais: o G_{BE} recebeu uma dose de 2,0 mg de

benzoato de estradiol e o G_{salina} recebeu 2,0mL de solução salina via intra muscular. Um total de 11 folículos foram inclusos para cada grupo experimental.

2.5 ULTRASSONOGRAFIA

Para as avaliações ultrassonográficas, cada animal foi devidamente contido em um brete apropriado, as fezes presentes no reto foram retiradas e o transdutor do aparelho de ultrassom inserido e posicionado manualmente pelo mesmo operador. Os exames ultrassonográficos foram realizados com um aparelho portátil de ultrassom equipado com função Doppler colorido e com um transdutor linear retal de 7,5 MHz (MyLab 30- Esaote, Gênova, Itália). Dentre as configurações do aparelho, foram selecionados previamente alguns padrões de ganhos de cor e frequência. A frequência utilizada foi de 7,5 MHz, com um ganho de cor de 70%. Foi utilizado uma frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,7 KHz, que refere-se ao número de pulsos por unidade de tempo. Neste caso foi utilizado um aparelho de onda pulsada, com uma profundidade de avaliação de 6,0 cm. A barra de velocidades (Velocity Range) utilizada foi de +0.05 a -0.05 m/s. Todas as avaliações foram realizadas utilizando-se a mesma frequência e padrão de ganhos e cor e padrões ultrassonográficos.

Após a localização do ovário, seguindo a ordem de avaliação (primeiro ovário direito, depois o esquerdo) foi feita a identificação do animal e do ovário avaliado em modo B na tela do ultrassom. Após a realização da identificação, os exames ultrassonográficos em B-mode e Doppler colorido foram iniciados antes da aspiração folicular e foram realizados a cada 12 horas por período de 72 h após a aspiração folicular.

2.6 PUNÇÃO FOLICULAR

Foi realizada a punção do folículo dominante imediatamente quando este apresentou um diâmetro médio de 12,0 mm segundo os procedimentos convencionais de OPU, conforme SENEDA et al., 2001 e SENEDA et al. 2003.

O ultrassom (MyLab 30- Esaote, Gênova, Itália) com um transdutor vaginal microconvexo foi adaptado a uma guia de punção folicular produzida com polímero com baixa absorção de umidade para evitar contaminação, para ser utilizado na aspiração. Uma agulha descartável esterilizada de 20G, com 7,0 cm de comprimento e bisel invertido foi conectada a um tubo Falcon de 50,0 mililitros (mL) por meio de um tubo flexível de silicone. A pressão negativa (65-70 Hgmm) foi aplicada utilizando uma bomba de vácuo para aspiração dos oócitos. O aspirado folicular foi imediatamente transferido para recipiente isotérmico a uma temperatura de 4-5°C até o momento da centrifugação. A coleta deste líquido foi efetuada diretamente do sistema de aspiração, para um microtubo estéril posicionado dentro de um tubo tipo Falcon para evitar qualquer possível contaminação. A centrifugação foi realizada a uma força de 480 x g em centrífuga laboratorial refrigerada (5°C). O sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis de 1,5 mL, previamente identificados, e estocado a -20°C até a realização das dosagens.

Neste estudo também foi efetuada a aspiração do folículo residual (FR) com 72h após a aspiração para análise das concentrações foliculares de estrógeno e progesterona.

A presença de um coágulo interno e pouco líquido folicular em alguns casos, não possibilitou a coleta dos mesmos nos FR.

2.7 ANÁLISES DE CONCENTRAÇÃO ESTRÓGENO E PROGESTERONA

As análises da concentração de progesterona e estrógeno do líquido folicular foram realizadas em aparelho de radioimunoensaio de fase sólida utilizando-se kits comerciais de análise por I¹²⁵ (Coat-a-Count[®], Medlab), no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP campus de Botucatu – SP (matrícula CNEN 14542).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros diâmetro folicular, concentração intrafolicular de estradiol e progesterona e a relação estrógeno: progesterona pré e pós-aspiração folicular foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Lilliefors e quanto a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Cochran e Bartlett. Quando atendidas as premissas de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos a análise de variância (Anova), e diferenças entre médias nos grupos experimentais (controle e tratamento com BE) foram comparadas pelo teste F. Caso contrário, foi realizada uma análise não paramétrica (Wilcoxon). Foi considerado, para definição de significância, um valor de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizada com o auxílio do Software SAEG 9.0 (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (EUCLIDES, 1982).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame após a aspiração, 81% (18/22) dos animais apresentaram folículos residuais (Tabela 2). No entanto, apenas 61% (11/18) dos folículos residuais foram identificados 72h após a aspiração e foram aspirados novamente (Tabela 2). Quatro animais não apresentaram folículo residual, sendo que um dos animais, na primeira avaliação (12h), apresentou um espessamento da parede folicular, formação semelhante a um corpo lúteo, com grande vascularização, sem formação de coágulo ou preenchimento com líquido em seu interior. Outro animal apresentou fato semelhante a este, porém após 72h da aspiração inicial. Este animal desenvolveu o folículo residual, com formação característica e no momento da segunda aspiração apresentava mesma formação de luteinização semelhante a um corpo lúteo.

Tabela 2. Resultado dos folículos residuais após tratamento com Benzoato de estradiol

	Animais aspirados	Folículos Residuais Formados (12h)	Folículos Residuais Aspirados (72h)
G _{salina}	11	90,0% (10/11)	50,0% (5/10)
G _{BE}	11	72,0% (8/11)	75,0% (6/8)

Os folículos foram aspirados com diâmetro médio de $12,7 \pm 2,3$ mm e os residuais aspirados apresentaram diâmetro médio de $10,7 \pm 3,4$ mm (Anexo 7 e 8). Após a aspiração dos folículos, os sinais de reincidência surgiam cerca de 12 horas após a aspiração, onde 72,7% dos animais (16/22) apresentavam a formação do folículo residual já primeira avaliação após a aspiração, o mesmo foi relatado por Dorea et al. (2011). Em dois animais, os folículos residuais foram visualizados apenas 36 h e 48 h após a aspiração respectivamente. A identificação se deu pela presença do coágulo no antro folicular.

Dos 11 animais tratados com benzoato, apenas um animal não apresentou folículo residual. Este animal foi o que apresentou na primeira avaliação aspecto de luteinização.

Tabela 3. Taxa de crescimento do folículo residual de acordo com o grupo de tratamento (média \pm desvio padrão)

Tempo de avaliação	G _{salina}	G _{BE}
12h	$9,7 \pm 2,2$ (8)	$9,0 \pm 3,4$ (8)
24h	$11,0 \pm 2,7$ (8)	$10,6 \pm 3,3$ (8)
36h	$10,8 \pm 2,6$ (7)	$9,4 \pm 2,5$ (8)
48h	$11,6 \pm 1,8$ (6)	$9,1 \pm 2,4$ (8)
60h	$11,6 \pm 3,1$ (5)	$9,1 \pm 2,9$ (7)
72h	$12,6 \pm 3,8$ (5)	$9,4 \pm 1,9$ (7)
TOTAL	$11,2 \pm 2,7^a$ (39)	$9,4 \pm 2,7^b$ (46)

O número entre parênteses refere-se ao n.

^{a,b} letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

O benzoato de estradiol não interferiu no aparecimento do FR, entretanto, quando se compara o crescimento folicular dos folículos residuais nos dois grupos (Tabela 3 e Figura 1) é possível observar que a taxa de crescimento do folículo residual no G_{salina} foi maior que o G_{BE} ($p < 0,001$) (Tabela 3). Até 24 horas da aspiração, ambos os grupos apresentam crescimento do FR. Entretanto, após este período, nota-se que o G_{BE} sofre uma queda no diâmetro nas 48 horas seguintes a esse pico de crescimento, enquanto o G_{salina} continua o seu desenvolvimento (Fig. 1).

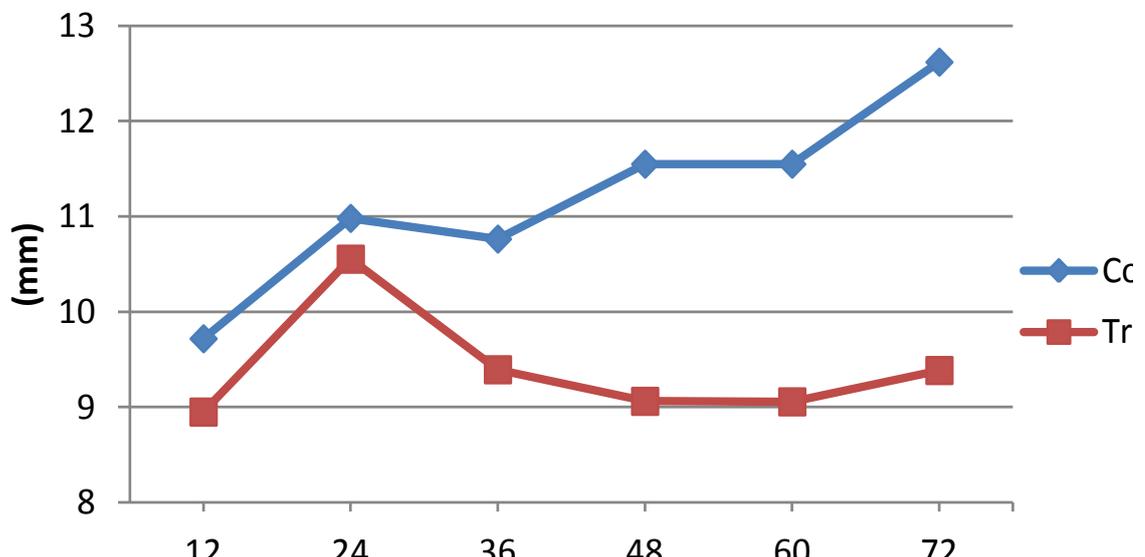


Figura 1. Medidas dos folículos residuais (mm) em função do tempo após aspiração. Houve diferença nos valores médios entre tratamentos, independente do dia ($P < 0,05$).

Com o objetivo de avaliar o efeito tratamento com benzoato de estradiol sobre o perfil esteroidogênico do folículo residual, o mesmo foi aspirado 72 horas após o primeiro procedimento de aspiração.

Na Tabela 4 é apresentado o perfil esteroidogênico dos folículos dominantes em cada um dos tratamentos. Para a classificação de um folículo dominante, dos 22 animais que iniciaram o experimento, 18 (81,8%) foram utilizados, pois quatro destes animais (18,2%) foram descartados, pois

apresentaram concentrações foliculares de estradiol baixas segundo classificação de Nishimoto et al. (2009), caracterizado assim como uma atresia folicular, não podendo assim ser inclusos nos tratamentos, padronizando desta forma o perfil dos folículos utilizados. A partir da relação entre esses E2 e P4, observa-se que as concentrações de estradiol no folículo dominante era cerca de 15 a 17 vezes maior do que as concentrações foliculares de progesterona, que segundo a classificação proposta por Nishimoto et al. (2009) este seria o perfil de um folículo ativo. Assim ambos os grupos, no início do ensaio, apresentavam folículos dominantes na mesma condição fisiológica.

Tabela 4. Perfil esteroidogênico dos folículos dominantes no momento da aspiração folicular (média \pm desvio padrão)

Respostas	N	G_{salina}	G_{BE}
Diâmetro do folículo dominante (mm)	22	12,8 \pm 2,7	12,3 \pm 2,0
Concentrações foliculares de E ₂ (ng/ml)	22	927,3 \pm 623,4	911,1 \pm 666,7
Concentrações foliculares de P ₄ (ng/ml)	22	65,3 \pm 43,0	82,0 \pm 73,0
E ₂ :P ₄	22	15,9 \pm 8,7	17,0 \pm 17,4

P>0,05

Foi determinado o perfil hormonal dos folículos residuais que se formaram após 72 horas da aspiração do folículo dominante. Dos 18 animais estudados, oito não apresentaram FR após 72 horas (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil esteroidogênico dos folículos residuais formados após a aspiração folicular

Respostas	G_{salina}	G_{BE}
Frequência	55,0% (5/10)	55,0% (5/10)
Diâmetro do folículo residual (mm) 12h	9,2 \pm 2,15 ^a	8,0 \pm 1,7 ^a
Diâmetro do folículo residual (mm) 72h	12,6 \pm 3,8 ^a	9,4 \pm 1,9 ^b
Concentrações foliculares de E ₂ (ng/ml)	53,5 \pm 49,6 ^a	0,3 \pm 0,3 ^b
Concentrações foliculares de P ₄ (ng/ml)	1.035,0 \pm 952,2 ^a	1.111,7 \pm 1.272,0 ^a
E ₂ :P ₄	0,05 \pm 0,03 ^a	0,001 \pm 0,00 ^b

^{a,b}Letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05)

O perfil hormonal dos folículos residuais apresentou diferença entre os grupos quanto às concentrações foliculares de estradiol ($p < 0,05$) e não ($P > 0,05$) quanto às concentrações foliculares de progesterona. Quanto à relação estrógeno/progesterona, observa-se que em ambos os grupos foram baixas, entretanto, o G_{BE} apresentou uma menor relação $E_2:P_4$ ($P < 0,05$).

O objetivo de extinguir ou ao menos minimizar a atuação e a presença do FR foi impedir sua influência na onda seguinte. Dentro de um programa de aspiração intensificado, qualquer tipo de alteração nas ondas subsequentes a aspiração podem prejudicar o processo. A tentativa de evitar a formação e a atividade do FR abre caminhos para estudos que procurem evitar a sua formação, com a intenção de melhorar os programas de aspiração folicular e sincronização da onda subsequente.

A hipótese testada trabalhou com a ideia de utilizar dentro do procedimento da aspiração folicular o uso da administração do benzoato de estradiol no momento do procedimento. Em parte a hipótese não foi provada, entretanto, não havendo eliminação física do FR com a aplicação do benzoato de estradiol, foi observado a diminuição da esteroidogênese nesses folículos.

A utilização do benzoato de estradiol após os procedimentos de aspiração folicular, procurava bloquear a ação rebote de FSH. Estudos indicam que a utilização do benzoato de estradiol leva o folículo dominante a atresia, por perda da função estrogênica (BURKE et al. 2001; BURKE et al. 2002). Após o procedimento de aspiração folicular, ocorre uma queda nas concentrações séricas do estradiol, ocorrendo assim um feedback positivo na hipófise anterior e levando a liberação do FSH (WILT BANK et al., 2000; GINTHER et al., 2002). As células da granulosa são induzidas a um crescimento por meio da ação do FSH, acarretando com isso na formação do antro folicular e a produção da aromatase. O LH tem atuação na estimulação da produção de andrógenos pelas células da teca, que sofrem aromatização em estradiol sob estímulo do FSH (KOHEK e LATRONICO, 2001). Neste estudo o feedback negativo do E_2 sobre a liberação de FSH pode ter levado a uma redução na produção de estradiol pelas células da granulosa do FR. Essa diminuição de estradiol intrafolicular, nos folículos residuais, faz com que estas

estruturas remanescentes após a aspiração tenham característica de folículos inativos, diferentemente do que pode acontecer quando não se faz o tratamento e o FR pode obter característica de um folículo estereidogenicamente ativo segundo classificação de Nishimoto et al. (2009), o que não foi encontrado nesse estudo, entretanto pode ocorrer como verificado por Dorea et al. (2011).

Possivelmente o acontecimento da diminuição da concentração de FSH pelo estradiol limitou o crescimento do folículo residual. Por ainda termos a formação do folículo residual, é possível que a dose utilizada de benzoato de estradiol no presente estudo (2 mg) não tenha sido capaz de inibir completamente a liberação do FSH, assim como encontrado por Burke et al., (2003), onde o pico de FSH foi encontrado somente 81 horas depois da aplicação do BE, e onde após a aplicação de 2 mg de BE, os níveis de FSH mantiveram constantes entre 1,5 e 2,0 ng/mL de FSH. O BE minimizou a ação do FSH, permitindo a diminuição da taxa de crescimento do folículo residual após 48h do início das avaliações, e assim permitindo a formação de um folículo de menor diâmetro. Estudos constataram a ação do estrógeno na diminuição da concentração de FSH, ou até mesmo na redução dos pulsos deste hormônio, entretanto eles não demonstram a completa inibição da ação dos hormônios gonadotróficos (PRICE E WEBB, 1988; BOLT et al., 1990). Charlesworth e Schwartz (1986) testaram diferentes doses de estrogênio para tentar suprimir o FSH em ratas, porém perceberam que nenhuma das doses aplicada era verdadeiramente eficaz em suprimir completamente os níveis de FSH.

A necessidade de extinguir a atividade estrogênica no FR é devido ao fato de que a diminuição desse estradiol em um folículo indica um dos primeiros eventos de um processo de atresia (XU et al., 1995), o que foi o objetivo deste estudo. Estudos recentes indicam que a diminuição nas concentrações de estradiol observadas durante a atresia folicular resulta diretamente na diminuição da enzima aromatase nas células da granulosa (VALDEZ et al., 2005). O fato de aumentar a concentração de estradiol no folículo pode culminar, na presença de fatores angiogênicos, na manutenção

do suporte de vascularização, contribuindo assim para manter a dominância (REDMER et al., 1991), ou mesmo o FR.

Burke et al. (2000) constataram que a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol, alcançou seu pico máximo no plasma em cerca de 4 horas após a aplicação. Permanecendo com concentração elevada até 24 horas após a aplicação e em 48 horas ainda não retornando as concentrações basais. Com a aspiração do folículo dominante, a ação do FSH sobre a onda subsequente inicia-se imediatamente, com um pico na secreção de FSH 29 horas após a ablação do dominante. Nossa hipótese de que a ação do BE inibindo a elevação do FSH após a aspiração folicular e impedindo a formação e aparecimento do folículo residual não foi comprovada. Outra explicação para a resposta encontrada é que não somente o FSH que influenciaria o aparecimento do FR, a combinação com um efeito rebote do LH possa ter suplementado o folículo logo após a aspiração. O LH tem a capacidade de suplementar o crescimento de folículos na presença ou não de FSH (LUCY, 2007), promovendo o desenvolvimento do FR. O fato da substituição dos receptores de FSH por LH, bem como a troca de dependência dos folículos dominantes por essas gonadotrofinas foi citada por Pawson and McNeilly (2005), onde inibina e estradiol inibem o FSH porém não inibem o LH.

Foi demonstrado em um estudo, que o LH não aumentou a quantidade de estradiol produzida pelas células da granulosa (FORTUNE et al., 2001). Sendo assim, neste estudo, o estradiol encontrado nos FR do grupo controle teve ação de FSH, enquanto o grupo tratamento, com níveis de estradiol em concentrações mais baixas, indicam diminuição dos níveis de FSH, porém não indicam bloqueio da sua atividade. Isto demonstraria que a utilização do benzoato de estradiol no momento da aspiração reduziria um nível alto de estradiol, que no caso do grupo controle poderia ser precursor de patologias como cisto folicular (BRAW-TAL et al., 2009).

Sendo significativa a diferença entre os níveis de estradiol e relação estradiol/progesterona do folículo residual entre o grupo controle e tratamento, é importante avançar sobre a aplicabilidade deste tratamento. A possibilidade de criar-se uma metodologia para que os programas de aspiração folicular

utilizem desta técnica, pode ser considerada e também avaliada sua eficácia nos diversos tipos de folículos residuais. A aplicação do benzoato comprovou ter finalidade prática no controle da esteroidogênese do folículo residual.

4. CONCLUSÃO

A aplicação de benzoato de estradiol no momento da aspiração não impediu a formação do folículo residual. Entretanto o benzoato de estradiol diminuiu o diâmetro e também a atividade estrogênica no FR dos animais tratados, demonstrando ter potencial para controle da esteroidogênese pós-aspiração em folículos residuais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLT D.J., SCOTT V., KIRACOFE G.H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 23, 4, 263-271, 1990.

BRAW-TAL R, PEN S, ROTH Z. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology*, v.72(5):690-8, 2009.

BURKE C. R., DAY M. L., BUNT C. R., MACMILLAN K. L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J ANIM SCI*, v.78:145-151, 2000.

BURKE CR, MORGAN S, MUSSARD ML, GRUM DE, DAY ML. Estradiol benzoate (EB) inhibits secretion of LH and induces atresia of dominant follicles within 36 hours in cyclic heifers. *J Anim Sci*, v.79:137, 2001.

BURKE CR, MUSSARD ML, GASSER CL, BEHLKE EJ, GRUM DE, DAY ML. Steroidogenic changes in dominant ovarian follicles undergoing atresia induced by estradiol benzoate (EB) in heifers. *Biol Reprod*, v. 66:83, 2002.

BURKE CR, MUSSARD ML, GASSER CL, GRUM DE, DAY ML. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*. v. 1;60(4):647-58, 2003.

CHARLESWORTH MC, SCHWARTZ NB. Estrogen inhibition of LH and FSH secretion: effects of a GnRH antagonist. *Am J Physiol*. V. 250, 341-5, 1986.

EUCLIDES, R.F. *Sistema de análise estatística e genética (SAEG)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 68, 1982.

DOREA M.D., PALHAO, M.P., ARASHIRO, E.K.N., FERNANDES, C.A.C., LUZ, M.R., VIANA, J.H.M. Occurrence of persistent follicles after ultrasound-guided follicle aspiration in cattle: preliminary results. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Recife, PE, Anais do XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal v.35, n.2 Belo Horizonte: CBRA 2011.

FORTUNE, J. E., G. M. RIVERA, A. C. EVANS, AND A. M. TURZILLO. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod*, v. 65:648–654, 2001.

GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, KOT K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction*, v.124, (4):475-82, 2002.

HAYASHI KG, MATSUI M, ACOSTA TJ, KIDA K, MIYAMOTO A. Effect of the dominant follicle aspiration before or after luteinizing hormone surge on the corpus luteum formation in the cow. *J Reprod*,v.52(1):129-35,2006.

KOHEK, MBF e LATRONICO, AC. O papel dos receptores das gonadotrofinas na reprodução feminina. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.45, n.4,369-374, 2001.

LUCY MC. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*. 85, 89-99, 2007.

NISHIMOTO H, HAMANO S, HILL GA, MIYAMOTO A, TETSUKA M. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. *J Reprod Dev*, v.55(2):219-24. 2009

PAWSON, A. J., MCNEILLY A. S.. The pituitary effects of GnRH. *Anim. Reprod. Sci*, v. 88:75–94. 2005.

PRICE CA, WEBB R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology*, v. (5):2222-31, 1988.

REDMER, D. A., J. D. KIRSCH, AND L. P. REYNOLDS. Production of mitogenic factors by cell types of bovine large estrogen-active and estrogen-inactive follicles. *J. Anim. Sci*, v. 69:237–245, 1991.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, OLIVEIRA JA, VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*, v. 3, (1-2), 37-43, 2001.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, ANDRADE ER, BINELLI M, OLIVEIRA JA, NASCIMENTO AB. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59(5-6), 1435-40, 2003.

VALDEZ, K. E., S. P. CUNEO, P. J. GORDON, AND A. M. TURZILLO. The role of theca androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *J. Anim. Sci*, v. 83:597–603, 2005.

VIANA, J. H. M. ; CAMARGO, L. S.A. ; FERREIRA, A. M. ; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular in vivo e fertilização in vitro no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 4, p. 477-478, 2001.

VIANA, JHM. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. *Pesq. Vet. Bras*, v.23,3, 119-124, 2003.

XU, Z. Z., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, S. A. HAMILTON, R. S. YOUNGQUIST. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*, v. 136:981–989, 1995.

WILTBANK MC, FRICKE PM, SANGSRITAVONG S, SARTORI R, GINTHER OJ. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.12: 2998-3007, 2000.

6. CONCLUSÃO GERAL

A presença de sinal Doppler em uma área correspondente a 25 a 50% da parede folicular é o padrão mais frequente em folículos pré-ovulatórios;

As avaliações, objetiva e subjetiva do sinal Doppler, são equivalentes para a avaliação do padrão vascular em folículos;

A aspiração folicular não interrompe a vascularização da parede folicular remanescente, podendo ocorrer um aumento transitório do fluxo sanguíneo do folículo residual subsequente;

A aplicação de benzoato de estradiol no momento da aspiração não impediu a formação do folículo residual;

A aplicação do Benzoato de estradiol no momento da aspiração tem potencial para controle da esteroidogênese após-aspiração em folículos residuais.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1 - Aprovação no comitê de ética



PARECER

PROTOCOLO CEUA-CNPGL Nº: 02/2011	Data de entrada: 24/02/2011 Data sessão: 02/03/2011
---	--

TÍTULO: Estabelecimento de modelos de referência in vivo para o desenvolvimento de sistemas de maturação oocitária in vitro

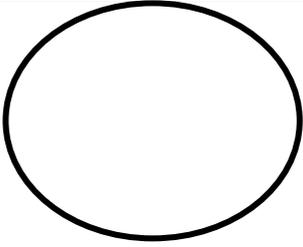
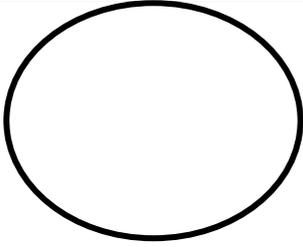
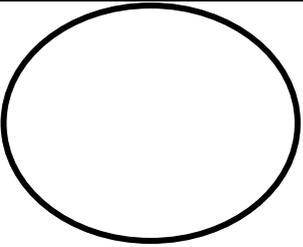
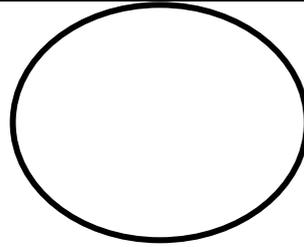
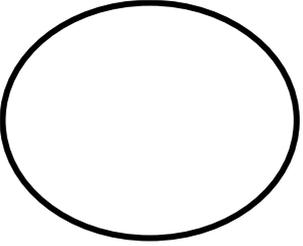
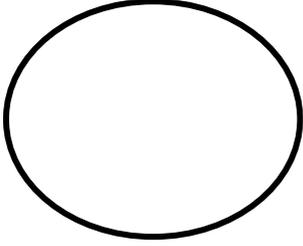
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: João Henrique Moreira Viana

CONSIDERAÇÕES APROVADAS PELO PLENÁRIO:		
A CEUA/CNPGL aprova os procedimentos adotados para o uso de animais do referido projeto.		
RETORNAR AO PESQUISADOR	SIM ()	NÃO (X)

CONCLUSÃO: APROVADO (X)	COM PENDÊNCIA ()	NÃO APROVADO ()
Nome e Assinatura do Presidente/Secretário da CEUA-CNPGL:		

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco - 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7402 - Fax: (32) 3311-
ceua@cnpq.embrapa.br

7.2 ANEXO 2 - Ficha de acompanhamento da dinâmica folicular

Experimento Doppler Colorido. Resp: Alberto Ghetti				
Animal #	OVÁRIO ESQUERDO		OVÁRIO DIREITO	
Data:				
Dia:				
Período:				
Hora:				
Vídeo	FD:	OBS:	FD:	OBS:
OE:	FS:		FS:	
OD:				
Data:				
Dia:				
Período:				
Hora:				
Vídeo	FD:	OBS:	FD:	OBS:
OE:	FS:		FS:	
OD:				
Data:				
Dia:				
Período:				
Hora:				
Vídeo	FD:	OBS:	FD:	OBS:
OE:	FS:		FS:	
OD:				

7.3. ANEXO 3

Tabela 1 Área de vascularização dos folículos de cada animal (cm²) de acordo com o tempo pós-aspiração (média ± desvio padrão)

Animal	Tempo após a punção folicular						
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1	0,05	0,13	0,11	0,15	0,29	0,15	0,07
2	0,05	0,25	0,14	0,12	0,13	0,20	0,14
3	0,11	0,09	0,05	0,04	0,09	0,07	0,02
4	0,16	0,14	0,14	0,24	0,08	0,07	0,12
5	0,10	0,12	0,06	0,05	0,02	0,04	0,11
6	0,29	0,05	0,06	0,07	0,13	0,16	0,22
7	0,20	0,13	0,21	0,40	0,42	0,13	0,40
8	0,11	0,19	0,28	0,23	0,21	0,28	0,20
9	0,08	0,10	0,09	0,17	0,21	0,24	0,25
10	0,08	0,14	0,18	0,10	0,34	0,08	0,22
TOTAL	0,12±0,07	0,13±0,05	0,13±0,07	0,15±0,10	0,19±0,12	0,14±0,07	0,17±0,10

7.4 ANEXO 4

Tabela 2. Parede do folículo (cm²) de cada animal de acordo com o tempo pós-aspiração (média ± desvio padrão)

Animal	Tempo após a punção folicular						
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1	0,48	0,65	0,61	0,85	0,35	0,47	0,70
2	0,56	0,46	0,36	0,28	0,27	0,39	0,32
3	0,46	0,36	0,18	0,19	0,18	0,18	0,41
4	0,52	0,43	0,29	0,27	0,29	0,26	0,11
5	0,36	0,47	0,48	0,48	0,53	0,55	0,54
6	0,72	0,16	0,18	0,16	0,26	0,24	0,60
7	0,49	0,27	0,44	0,57	0,57	0,20	0,51
8	0,33	0,30	0,63	0,44	0,56	0,59	0,47
9	0,48	0,27	0,29	0,34	0,39	0,45	0,36
10	0,49	0,33	0,43	0,42	0,58	0,45	0,63
TOTAL	0,49±0,11	0,37±0,14	0,39±0,16	0,40±0,20	0,40±0,15	0,38±0,15	0,47±0,17

7.5. ANEXO 5

Tabela 3. Percentagem (%) da vascularização dada pela razão entre a área de vascularização e a área da parede do folículo (média \pm desvio padrão)

Animal	Tempo após a punção folicular						
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1	12,2	20,1	18,8	17,6	82,3	32,1	9,5
2	8,5	54,1	38,9	43,5	49,6	50,5	43,7
3		25,8	25,8	19,2	52,3	39,6	5,6
4	24,8	24,8	48,5	88,2	28,9	29,0	114,3
5	30,8	30,8	13,2	10,8	4,0	7,3	21,2
6	27,1	27,1	33,2	46,0	49,4	67,9	36,1
7	40,6	40,6	47,1	69,6	74,6	65,8	79,5
8	40,7	40,7	44,6	51,4	37,5	47,8	42,1
9	32,8	32,8	31,1	50,0	53,0	53,7	68,7
10	17,2	42,3	42,9	23,2	58,0	17,6	35,2
TOTAL	26,08 \pm 11,59	33,91 \pm 10,36	34,41 \pm 12,18	41,95 \pm 24,74	48,96 \pm 22,20	41,13 \pm 19,85	45,59 \pm 33,53

7.6. ANEXO 6

Tabela 4. Acompanhamento do diâmetro do folículo residual a partir do momento das aspiração.

Animal	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1	16,0	9,8	11,1	13	13	14,7	14,5
2	18,1	7,7	9,5	13,3	15	14,7	14,1
3	11,7	11,3	11,1	11	12	11,7	10,4
4	12,8	9,3	11,8	13,4	13,8	14,4	15
5	11,8	4,7	5,2	6,1	6,1	9,3	10,8
6	10,2	10,2	10,7	7,2	7,3	7,9	7,8
7	13,3	8	8,6	9,9	9	10	11
8	10,2	6	8,4	10,5	11,8	13	14,4
9	10,8	9,4	7	6,6	5,5	5,8	6,3
10	14,1	5,7	5	5,4	5,2

7.7 ANEXO 7

Tabela 4. Acompanhamento do diâmetro do folículo residual no G_{BE}

Animal	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	OBS
1	12,0	10,5	10,45	10,5	10,7	11,1	11,1	ASP
2	12,9	6,3	7,9	6,6	8,1	8,65	9,35	ASP
3	16,6	6,65	6,2	9,05	10,15	10,85	10,25	LUT
4	12,0	5,5	12,4	12,85	8	-----	-----	
5	11,0	LUT	-----	-----	-----	-----	-----	
6	9,3	-----	-----	-----	6,4	4,7	7,1	ASP
7	11,0	8,9	9,55	12,6	13,1	13	11,7	ASP
8	13,2	7,2	9,5	9,75	10,15	8,95	9,4	ASP
9	15,1	15,95	17,33	-----	-----	-----	-----	
10	12,4	10,6	11,1	6,55	-----	-----	-----	
11	9,3	-----	-----	7,25	5,9	6,15	6,8	ASP

* Os quadros em branco são marcados pela não formação ou involução dos FRs

ASP – ASPIRADO LUT- LUTEINIZADO

7.8 ANEXO 8

Tabela 5. Acompanhamento pós-aspiração do diâmetro (cm) dos FRs do G_{salina}

Animal	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	OBS
1	13,1	10,20	12,35	12,95	12,95	13,45	14,55	ASP
2	12,0	11,25	11,70	12,80	12,55	12,85	16,05	ASP
3	10,0	5,60	6,75	6,65	7,65	5,50	5,20	ASP
4	18,0	13,70	15,00	7,65	-----	-----	-----	
5	13,2	9,60	12,25	9,30	11,55	13,80	14,05	ASP
6	14,4	10,10	11,80	13,50	12,30	-----	-----	
7	15,0	7,50	6,40		-----	-----	-----	
8	12,5	9,80	11,60	12,50	12,30	12,15	13,25	ASP

* Os quadros em branco são marcados pela não formação ou involução dos FRs

ASP – ASPIRADO LUT- LUTEINIZADO