



Avaliação ultra-sonográfica e endócrina da resposta ovariana a uma dose de eCG seguindo um tratamento com CIDR por 14 dias durante a estação reprodutiva em cabras¹

Luis Fernando Uribe-Velásquez², Maria Inês Lenz Souza³, José Henry Osorio⁴

²Departamento de Saúde Animal, Universidade de Caldas, Manizales, Colômbia.

³Departamento de Morfofisiologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, MG, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Básicas, Universidade de Caldas, Manizales, Colômbia.

lfuribe@ucaldas.edu.co

(Recibido: 17 febrero, 2008; aprobado: 29 abril, 2008)

RESUMEN: O objetivo do presente trabalho foi comparar os efeitos de diferentes doses da gonadotrofina coriônica equina (eCG) na dinâmica folicular e nas concentrações hormonais em cabras Alpinas. Para isto, submetem-se estas fêmeas à sincronização do estro e da ovulação com um dispositivo interno contendo 0,3 g de progesterona durante 14 dias durante a estação reprodutiva. As fêmeas caprinas (n = 24) foram divididas aleatoriamente, em quatro grupos de seis animais. No dia da remoção do dispositivo, os animais receberam 0 (T1-Controle), 200 (T2), 300 (T3) e 400 UI de eCG (T4). O desenvolvimento folicular foi observado ultra-sonograficamente, iniciando um dia antes da administração da eCG até a seguinte ovulação. Determinaram-se, a cada dia as concentrações plasmáticas de E₂ and P₄ por RIA. As variáveis contínuas foram avaliadas pela análise de variância seguindo os procedimentos GLM do pacote estatístico SAS. A comparação das médias realizou-se utilizando o Teste de tukey-kramer. A resposta ao estro para todos os grupos tratados foi do 100%. Observaram-se ciclos estrais com três e quatro ondas de crescimento folicular. O tamanho do folículo maior foi menor (P<0,01) em animais controle da onda 3 (5,5±0,50 mm) quando comparado com o tratamento 3 na mesma onda (7,17±0,35 mm). Os efeitos da eCG no crescimento folicular mostraram um aumento significativo na quantidade de folículos pequenos e médios (P<0,05) em relação ao grupo controle. A quantidade média de corpos lúteos foi superior (P<0,05) no T4 (400UI) que no T2 (200 UI) mostrando 4,27±0,23 vs 1,95±0,19 CL, respectivamente. Houve diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de P₄ (P<000,01) and E₂ (P<0,001) entre os tratamentos. O uso do CIDR somado à injeção intramuscular de eCG foi efetivo na indução do estro, aumentou o recrutamento de folículos pequenos e acelerou o mecanismo de crescimento folicular em cabras Alpinas.

Palabras clave: alpina, dinâmica folicular, estradiol, progesterona, sincronização do estro, ultra-sonografia.

Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of eCG following a 14-day treatment with CIDR in the breeding season in goats

ABSTRACT: The objective of the present study was to compare the effect of different dosage of equine chorionic gonadotrophin (eCG) on the follicular dynamics and hormonal concentrations in Alpine goats, which were subjected to estrous and ovulation synchronization protocols with controlled internal drug released (CIDR) devices containing 0.3 g of progesterone for 14 days during breeding season. Female goats (n = 24) were divided at random into four groups of 6 animals each. On the day of the dispositive removal, the animals received 0 (T1-Control), 200 (T2), 300 (T3) and 400 UI of eCG (T4). Follicular development was observed ultrasonographically starting 1 day prior to eCG administration until the next ovulation. The daily plasma E₂ and P₄ concentrations were determined using RIA. The continuous variables were evaluated with the variance analyses under GLM procedures of SAS statistical package. The mean comparison was carried out with the Tukey-Kramer test. Estrous response for all treatment groups was 100%. Estrous cycles with three and four waves of follicular growth were observed. The size of the largest follicle was smaller (P<0.01) in control animals of wave 3 (5.5x0.50 mm) when compared with the Treatment 3 at the same wave (7.17x0.35 mm). The effects of eCG on follicular growth showed a significant increase in the number of small and medium follicles (P<0.05) than for the control group. The mean number of corpora lutea were higher (P<0.05) in T4 (400 UI) than T2 (200 UI), showing 4.27x0.23 vs 1.95x0.19 CL, respectively. There were significant differences in plasma concentrations P₄ (P<000.01) and E₂ (P<0.001) among treatments. The use of CIDR plus intramuscular injection of eCG was effective in inducing estrus, increasing the recruitment of small follicles and accelerating the mechanism of follicular growth in Alpine goats.

Key words: alpine, follicular dynamics, oestradiol, oestrous synchronization, progesterone, ultrasonography.

¹ Projeto financiado pela FAPESP - Sao Paulo - Brasil e pela VIP - Universidad de Caldas - Colombia - Convocatoria/2006.

Introdução

A utilização da ultra-sonografia na reprodução permite a monitoração diária do desenvolvimento folicular ovariano durante o ciclo estral, demonstrando claro padrão do crescimento e regressão de folículos antrais, e possibilita o entendimento do processo de recrutamento, seleção e dominância folicular em ovelhas (Liu et al., 2007) e cabras (Amorim et al., 2007).

Algumas biotécnicas como a indução e a sincronização do estro em caprinos vêm sendo bastante utilizadas, por proporcionarem atividade reprodutiva, mesmo durante os períodos de anestro sazonal e lactacional. Os métodos mais utilizados para a sincronização do estro e da ovulação e da estimulação do crescimento folicular em pequenos ruminantes envolvem progesterona (P_4) e/ou progestágenos e a administração intramuscular de eCG (Martínez et al., 2007; Uribe-Velásquez et al., 2008a). A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) é produzida pelo endométrio das fêmeas eqüinas entre os dias 40 e 130 de gestação, a qual apresenta atividade semelhante ao FSH (80%) mas também alguma atividade de LH (20%) (Barret et al., 2004). Doses baixas de eCG (350-500 UI) são comumente usadas em ovelhas cíclicas depois do pré-tratamento com progestágenos para sincronizar e diminuir o intervalo estro-ovulação (Cline et al., 2001). Tratamentos com doses baixas de eCG limitam a taxa de ovulação (Barret et al., 2004) e fertilidade (Ali, 2007) em ovelhas cíclicas. O tratamento com 500 UI de eCG pode modificar a quantidade de folículos antrais, tamanho, capacidade esteroidogênica e crescimento folicular (Barret et al., 2004). Tratamentos em ovelhas Suffolk com 1000 UI de eCG mostraram valores semelhantes na porcentagem de mórulas e blastocistos colhidos, quando comparados com a administração de FSH (Silveira & Kozicki, 2001). Na ovelha, a eCG incrementa a taxa de ovulação pelo recrutamento dos folículos antrais pequenos, eleva sua taxa de crescimento e altera a relação dos diferentes tamanhos foliculares no estro (Driancourt & Fry, 1992). Entretanto, a eCG não diminui os efeitos de atresia folicular (Moor et al., 1985).

Folículos expostos à eCG sintetizam quantidades maiores de progesterona (Driancourt & Frick, 1992). Da mesma forma, têm-se reportado que o uso repetitivo da eCG, sendo um hormônio de origem animal, pode gerar anticorpos inter-espécies (Hervé et al., 2004), os quais podem interferir na resposta ovulatória e atrasar o estro com o detrimento da fertilidade, principalmente em cabras (Drion et al., 2001).

Os efeitos da dose de eCG em cabras e, particularmente durante a estação reprodutiva, é de considerável interesse para elucidar os mecanismos que facilitem a instauração de programas que controlam a reprodução em pequenos ruminantes. Além do mais, são muito poucos os estudos no Brasil relacionando diferentes dosagens de eCG e desenvolvimento folicular em cabras leiteiras.

Mediante o uso da ultra-sonografia transretal e a quantificação dos hormônios reprodutivos buscou-se avaliar os efeitos da sincronização do estro com progestágeno, utilizando CIDR durante 14 dias e diferentes doses de eCG (200, 300 e 400 UI), sobre o desenvolvimento folicular e a endocrinologia reprodutiva em fêmeas caprinas Alpinas durante a estação reprodutiva.

Material e Métodos

O trabalho experimental foi desenvolvido na FMVZ/UNESP-Botucatu-SP, utilizando-se 24 fêmeas caprinas adultas da raça Alpina, durante a estação reprodutiva, com peso corporal de 35 a 42 kg, com idades de dois a cinco anos. Os animais foram mantidos em boxes de 3 X 3 m, sob luminosidade natural. As fêmeas foram distribuídas em quatro grupos, sendo o Grupo 1 (n = 6), o tratamento controle apresentando estro natural; os Grupos 2, 3, e 4 (n = 6 por grupo), tratados com progesterona (CIDR, AHI Plastic Moulding Company, Hamilton, New Zealand) por 14 dias, contendo 0,3 g de progesterona. No momento da remoção do dispositivo, administraram-se 200, 300 e 400 UI de eCG (Novormon 5000[®], Gonadotrofina coriônica eqüina, Syntex, S.A., Buenos Aires, Argentina), respectivamente

nos Grupos 2, 3, e 4. A partir desse momento, monitoraram-se as cabras por meio de ultrassom (SSD-500; Aloka Co. Ltda, Japão) com transdutor linear prostático humano de 7,5 Mhz de frequência (Modelo UST-660-7,5; Aloka Co. Ltda, Japão). O dia da ovulação (dia zero) definiu-se a partir do momento do desaparecimento do maior folículo (> 5 mm). As imagens ecográficas foram armazenadas em vídeo e desenharam-se diagramas da posição de todos os folículos > 2 mm. As fêmeas mantiveram-se com um macho vasectomizado para observação da apresentação do estro.

A alimentação consistiu de uma ração concentrada (20% de proteína bruta e 5,05% de fibra bruta) e feno de *Cynodon dactylon* (L) "Coast Cross" (4,98% de proteína bruta e 35,88% de fibra bruta, na matéria seca). Os animais receberam 1,5 kg/cabeça/dia de concentrado e 2,0 kg/cabeça/dia de feno, com disponibilidade *ad libitum* de mistura mineral e água.

Em todas as ovelhas, pela manhã (8 h), colheram-se amostras de sangue, por venopunção jugular, antes da retirada do dispositivo e durante todo o período experimental. As amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados e, imediatamente após, centrifugadas a 2.500 rpm durante 15 minutos, e o plasma armazenado a -20°C, para posterior determinação hormonal por radioimunoensaio (RIA). A quantificação de P₄ realizou-se com a técnica definida por Lafrance & Goff (1985), com algumas mudanças. Assim, a extração foi trocada pelo danazol (McGinley & Casey, 1979), e a separação do duplo anticorpo foi substituída pelo charcol. A sensibilidade do ensaio para P₄ foi de 0,1 ng/ml. Todas as amostras foram analisadas num só ensaio, o qual foi desenvolvido no Centro de Investigação de Reprodução Animal-CRRA, da Université de Montréal, St-Hyacinthé, Québec, Canada. A sensibilidade do ensaio para estradiol (E₂) foi de 8 pg/ml e a dosagem feita por RIA, no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP-Botucatu, utilizando-se kits comerciais Coat-A-Count (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles,

CA, USA) em fase sólida, e um contador gamma Vitek Count 48.

Os efeitos dos tratamentos nas concentrações plasmáticas de P₄ e E₂ foram determinados pela análise de medidas repetidas utilizando-se o programa Statistical Analysis System (Latour & Littell, 1996). Para os efeitos fixos (tratamento, dia, tratamento x dia) utilizou-se o teste F, e para as comparações múltiplas das médias, o teste de tukey-kramer. Para a análise da taxa de crescimento e a população folicular total usou-se ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste F. Os folículos classificaram-se como pequenos (2-2,5 mm), médios (3-3,5 mm) e grandes (> 4 mm). As médias da população dos folículos pequenos, médios e grandes foram transformadas antes de serem submetidas à ANOVA, e as médias, comparadas pelo teste F.

Resultados e Discussão

Todas as fêmeas caprinas dos grupos experimentais apresentaram o estro nas 72 horas seguintes ao final da sincronização, sem apresentar diferença estatística (P>0,05), corroborando com os intervalos achados por Kridli & Al-Khetib (2006) e Barrett et al. (2004), trabalhando com 600 e 500 UI, respectivamente. Doses de 1250 UI de eCG foram utilizadas por Riesenberget al. (2001) em cabras, durante a época de baixa fertilidade mostrando o mesmo tempo de intervalo. No trabalho de Fonseca et al. (2008), utilizando 200 UI de eCG e administrando prostaglandina no momento de retirada da esponja (dia nove) em cabras Alpinas em diferentes estágios fisiológicos, observou-se uma redução do intervalo ao estro, com 88% dos animais mostrando o estro nas primeiras 36 horas.

Segundo Freitas & Salles (2000), a injeção de 200 UI de ECG em cabras Saanen sincronizadas com progestágenos, modifica o tempo do intervalo entre remoção do dispositivo e início do estro, mas não a variabilidade quando comparados com os animais que não receberam a gonadotrofina (22,6±10,1 *versus* 26,6±10,6 h). Os tratamentos hormonais com progestágenos associados ao eCG

têm apresentado bons resultados de respostas de estro, uma vez que essa gonadotrofina atua no recrutamento folicular ovariano de fêmeas cíclicas ou acíclicas (Mies Filho et al., 1989).

Nenhum dos fatores como localização dos ovários, condição corporal ou peso vivo afetaram o monitoramento dos ovários mediante a avaliação ultra-sonográfica. Foram identificadas quatro ondas de crescimento folicular em três animais do grupo controle. Nas fêmeas restantes deste grupo (T1, três animais) e nos grupos T2 (200 UI), T3 (300 UI) e T4 (400 UI) que tiveram seis animais/grupo, observaram-se três ondas de desenvolvimento folicular. Achados semelhantes foram reportados por Tenório Filho et al. (2007), pesquisando em cabras Anglo-Nubianas, os quais observaram a apresentação de três (33,3%) e de quatro ondas (66,6%) de desenvolvimento folicular.

As médias \pm EP das características do folículo dominante (FD) nas ondas de crescimento folicular são apresentadas na Tabela 1.

O dia de emergência do folículo dominante (FD) nas três ondas de crescimento folicular, não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, apresentando valores muito semelhantes aos reportados por Tenório Filho et al. (2007).

O dia do diâmetro máximo do FD nas ondas um e dois não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Já, na onda três o dia do diâmetro máximo foi diferente entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

O FD ovulatório da onda três nos Grupo Controle (T1), no grupo tratado com 200 UI (T2) e 300 UI de eCG (T3) atingiu seu diâmetro máximo bem mais tarde que os animais do Grupo T4, tratados com 400 UI de eCG. Os valores para o FD dos animais controle foram próximos aos mostrados por Uribe-Velásquez et al. (2002).

O diâmetro máximo atingido pelo FD na onda um foi significativamente superior ($P < 0,01$) no T4 ($6,67 \pm 0,35$ mm) quando comparado com os

animais do T1 ($4,16 \pm 0,50$ mm). Evento semelhante observou-se na onda três. Nessa onda, as fêmeas do T3 mostraram um diâmetro máximo superior ($7,17 \pm 0,35$ mm; $P < 0,01$) quando comparado com as fêmeas controle ($5,5 \pm 0,50$ mm). Para o diâmetro máximo observado no FD foram reportados valores de $8,2 \pm 0,8$ mm por Barrett et al. (2004), os quais mostraram-se superiores aos reportados na presente pesquisa. Entretanto, Uribe-Velásquez et al. (2002) reportaram valores semelhantes para o diâmetro máximo do FD em ovelhas utilizando 500UI.

Cabe anotar, que o *status* folicular no início da resposta superovulatória provoca diversos efeitos. Assim, Menchaca et al. (2007) relataram que o início da resposta superovulatória na ausência de folículos grandes desencadeou uma maior taxa de ovulação e uma melhor produção de embriões em cabras Alpinas. A administração de eCG no momento de retirada do dispositivo (CIDR), possivelmente diminuiu os efeitos negativos de P_4 na dinâmica do crescimento folicular e ovulação, conforme os achados de Noel et al. (1994). O crescimento do FD nos animais tratados com o eCG foi maior que no grupo controle, concordando com os resultados de Ali (2007).

O aumento do diâmetro folicular do FD nos animais recebendo eCG, pode ter sido provocado pelos efeitos da gonadotrofina no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, e pelas alterações nos mecanismos regulatórios intraovarianos devido, principalmente, a sua meia vida prolongada e pela sua atividade semelhante ao LH e ao FSH. Assim, estas propriedades não somente são benéficas, como, também, têm seus efeitos negativos na seqüência normal dos eventos fisiológicos do desenvolvimento folicular e maturação oocitária (Noel et al., 1994).

Os dias de platô não apresentaram diferença significativa para os grupos experimentais, com valores médios entre 1 e 2 dias, similares aos resultados demonstrados por Rubianes et al. (1996). Já valores superiores de $2,4 \pm 0,6$ dias para esta fase tem sido reportados por Barrett et al. (2004).

Tabela 1. Médias \pm EP das características do folículo dominante (FD) nas três ondas de crescimento folicular em cabras tratadas com CIDR seguido de eCG: T1 (Controle – Estro natural); T2 (CIDR + 200 UI de eCG); T3 (CIDR + 300 UI de eCG); T4 (CIDR + 400 UI de eCG).

Grupos experimentais	Onda 1				Onda 2				Onda 3			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Dia de emergência	0,33 \pm 0,56	0,16 \pm 0,39	0,50 \pm 0,39	0,17 \pm 0,39	7 \pm 0,56	6,5 \pm 0,39	5,8 \pm 0,39	6,5 \pm 0,39	13 \pm 0,56	14 \pm 0,39	13,8 \pm 0,39	12,2 \pm 0,39
Máximo diâmetro (dia)	4,66 \pm 0,84 <i>d</i>	6,33 \pm 0,59 <i>d,e</i>	5,67 \pm 0,60 <i>d</i>	5,5 \pm 0,60 <i>e</i>	12 \pm 0,84	11,67 \pm 0,6	10,17 \pm 0,6	11,17 \pm 0,6	19 \pm 0,84 <i>b</i>	20 \pm 0,60 <i>b</i>	20,12 \pm 0,6 <i>b</i>	17,83 \pm 0,6 <i>a</i>
Diâmetro máximo (mm)	4,16 \pm 0,50	5,33 \pm 0,35	4,75 \pm 0,35	6,67 \pm 0,35	4,66 \pm 0,5	4,7 \pm 0,35	4,77 \pm 0,35	5,41 \pm 0,35	5,5 \pm 0,5 <i>d</i>	6,42 \pm 0,35 <i>d,e</i>	7,17 \pm 0,35 <i>e</i>	6,75 \pm 0,35 <i>d,e</i>
Dias platô	1,5 \pm 0,22	1,33 \pm 0,35	2 \pm 0,00	1,33 \pm 0,33	1,17 \pm 0,17	1 \pm 0,00	1,33 \pm 0,21	1,67 \pm 0,33	1,17 \pm 0,2	1,33 \pm 0,21	1,17 \pm 0,17	1,67 \pm 0,33
Taxa de crescimento (mm/d)	0,90 \pm 0,13	0,93 \pm 0,09	0,95 \pm 0,09	1,30 \pm 0,10	0,96 \pm 0,13	0,92 \pm 0,10	1,01 \pm 0,09	1,17 \pm 0,10	0,96 \pm 0,1	1,10 \pm 0,1	1,21 \pm 0,10	1,22 \pm 0,12

Letras minúsculas diferentes na linha dentro de cada onda folicular são diferentes, a vs b ($P < 0,05$).
Letras minúsculas diferentes na linha dentro de cada onda folicular são diferentes, d vs e ($P < 0,01$).

Do mesmo modo, a taxa de crescimento não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, variando de 0,89 mm/dia (Onda 1, T1) a 1,30 mm/dia (Onda 1, T4). Os valores observados para a taxa de crescimento estão de acordo com os resultados obtidos no trabalho de Castonguay et al. (1990) em ovelhas (0,9 a 1,7 mm/dia) y de Ali (2007), trabalhando também em ovelhas (1,02 a 1,06 mm/dia). Leyva et al. (1998) sugerem que, a taxa de crescimento de alguns folículos, quando comparada com outros que crescem mais rapidamente, pode desencadear fortes implicações na qualidade do oócito no momento da ovulação.

As Médias \pm EP do número de folículos presentes em cada categoria, grandes (> 4 mm), médios (3-3,5 mm) e pequenos (2-2,5 mm) em cada onda de desenvolvimento folicular, nos diferentes tratamentos, são apresentadas na Tabela 2.

Durante o início e metade da fase luteal observou-se, em todos os dias, crescimento dos folículos pequenos. A aplicação de eCG (T2 - 200 UI; T3 - 300 UI e T4 - 400 UI de eCG) provocou aumentos significativos ($P < 0,05$) nos folículos pequenos na primeira (T1: $4,2 \pm 0,13$; T2: $10,2 \pm 0,72$; T3: $11,2 \pm 0,62$, e T4: $10,5 \pm 0,13$ folículos pequenos), e segunda ondas (T1: $6,2 \pm 0,14$; T2: $8,2 \pm 0,15$; T3: $9,2 \pm 0,17$, e T4: $9,6 \pm 0,22$ folículos pequenos) de crescimento folicular. Na terceira onda de crescimento não foram observadas diferenças significativas.

O aumento do recrutamento folicular, assim como a manutenção destes novos folículos nos grupos tratados com o eCG, pode resultar das mudanças mediadas pelo progestágeno (CIDR) na frequência dos pulsos de LH.

Estudos tem mostrado que as concentrações de progesterona estão implicadas no tamanho do folículo. Assim, folículos que crescem no meio de altas concentrações de progesterona são menores daqueles que tem-se desenvolvido recebendo baixas concentrações de progesterona (Ginther & Kot, 1994), fato que tem sido observado na presente pesquisa. Segundo Uribe-Velásquez et al. (2008b), os efeitos inibitórios da P_4 exógena

na dinâmica folicular ovina tem sido mediada pelas alterações observadas na frequência dos pulsos de LH. O mecanismo dessa inibição pode ter seus efeitos nos programas de sincronização do estro e da ovulação, assim como os protocolos envolvendo superovulação em pequenos ruminantes.

A administração do CIDR seguido de eCG (750 UI) na sua retirada em ovelhas Suffolk, gerou um maior recrutamento de folículos > 2 mm nas 22 horas seguintes, mas a referida quantidade diminuiu com o tempo, chegando a ser menor que o grupo controle nas 52 horas seguintes (Leyva et al., 1998).

Os resultados para a quantidade média dos folículos pequenos assemelhou-se aos achados de Noel et al. (1994), os quais utilizando laparoscopia em ovelhas Suffolk, observaram que a aplicação de 800 UI de eCG depois da retirada da esponja intravaginal (40 mg de FGA), aumentou a população dos folículos pequenos durante a fase folicular, diminuindo logo depois na terceira onda de desenvolvimento folicular, sem apresentar diferenças significativas quando comparados com o controle. Resultados semelhantes foram ainda obtidos por Ali (2007) e Uribe-Velásquez et al. (2008a) trabalhando também em ovelhas, com a mesma dose de eCG, seja administrado antes ou no momento da remoção do dispositivo de progesterona. A população de folículos pequenos incrementou-se após a remoção da esponja de progesterona, nas cabras testadas por Riesenberget al. (2001), utilizando 1200 UI de eCG.

Na primeira onda de desenvolvimento folicular, os resultados mostraram uma significativa diminuição ($P < 0,05$) na quantidade de folículos médios do grupo controle (T1) quando comparado com os grupos tratados (T1: $2,0 \pm 0,8$; T2: $3,6 \pm 0,12$; T3: $4,2 \pm 0,23$, e T4: $5,5 \pm 0,13$ folículos médios) e, da mesma forma, na segunda onda (T1: $3,4 \pm 0,7$; T2: $5,5 \pm 0,9$; T3: $6,2 \pm 0,10$, e T4: $6,0 \pm 0,13$ folículos médios). A terceira onda de crescimento teve uma leve diminuição no número de folículos médios, sendo ainda significativa ($P < 0,05$) e diferente do controle.

Tabela 2. Médias \pm EP do número de folículos grandes, médios e pequenos presentes em cada onda de crescimento folicular em cabras Alpinas tratadas com CIDR seguido de eCG: T1 (Controle); T2 (CIDR + 200 UI de eCG); T3 (CIDR + 300 UI de eCG), e T4 (CIDR + 400 UI de eCG).

Ondas de crescimento	Onda 1				Onda 2				Onda 3			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Grupos experimentais												
Folículos grandes (> 4 mm)	2 \pm 0,50	2,5 \pm 0,19	2,7 \pm 0,17	2,4 \pm 0,18	3,7 \pm 0,13	3,5 \pm 0,13	4,2 \pm 0,13	4,1 \pm 0,12	3,5 \pm 0,1	4,2 \pm 0,12	3,9 \pm 0,15	3,8 \pm 0,17
Folículos médios (3-3,5 mm)	2 \pm 0,80 a	3,6 \pm 0,12 b	4,2 \pm 0,23 b	5,5 \pm 0,13 c	3,4 \pm 0,70 a	5,5 \pm 0,90 b	6,2 \pm 0,10 b	6 \pm 0,13 b	4,2 \pm 0,9 a	5,2 \pm 0,32 b	5,6 \pm 0,23 b	5,8 \pm 0,19 b
Folículos pequenos (2-2,5 mm)	4,2 \pm 0,13 a	10,2 \pm 0,72 b	11,2 \pm 0,62 b	10,5 \pm 0,13 b	6,2 \pm 0,14 a	8,2 \pm 0,15 b	9,2 \pm 0,17 b	9,6 \pm 0,22 b	7,5 \pm 0,1	7,7 \pm 0,29	8,0 \pm 0,51	7,6 \pm 0,43

Letras minúsculas diferentes na linha dentro de cada onda folicular são estatisticamente diferentes, (a,b,c,d; P< 0,05).

A aplicação do progestágeno seguido de eCG (100, 200 ou 300 UI) provocou significativamente ($P < 0,05$), um maior número de folículos médios crescendo nas fases folicular e luteal do ciclo estral. Possivelmente, o maior número de folículos médios após ovulação, pode ser atribuído ao maior *pool* de folículos pequenos presentes, assim como, também, pode ter sido um indicador da prevenção do processo de atresia, exercida pela administração de eCG.

A quantidade média dos folículos grandes não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais, ainda que, durante a primeira e a segunda ondas foliculares, os grupos T3 e T4 tratados com o CIDR seguido por 200 e 300 UI de eCG, respectivamente, tenham apresentado um número superior de folículos grandes. Resultados semelhantes foram encontrados por Noel et al. (1994), que verificaram um número significativamente maior de folículos grandes em ovelhas Suffolk, administrando respectivamente, CIDR + 750 UI de eCG ou 40 mg de FGA + 800 UI de eCG.

Entretanto, uma pesquisa desenvolvida por Castonguay et al. (1990), destacou que, possivelmente, um número significativo de folículos apresentando um diâmetro de 1-3 mm, pode induzir a atresia dos folículos grandes em fêmeas ovinas.

Estes resultados mostram que, em cabras Alpinas, o crescimento dos folículos antrais maiores que 2 mm, acontece em todos os dias, durante o início e metade da fase luteal do ciclo estral. Durante cada onda de desenvolvimento, folículos maiores que 2 mm desenvolveram-se de um *pool* e, só alguns, continuaram sua maturação e crescimento e, segundo Noel et al. (1993) e Ravindra et al. (1994), estes folículos atingem a ovulação (folículo dominante ovulatório) ou sofrem atresia (folículos não ovulatórios).

O perfil das concentrações de progesterona no plasma (Médias \pm EP) dos grupos experimentais está apresentado na Figura 1. Houve diferença estatística significativa nos dias ($P < 0,0001$) e na interação tratamento x dia ($P < 0,0001$).

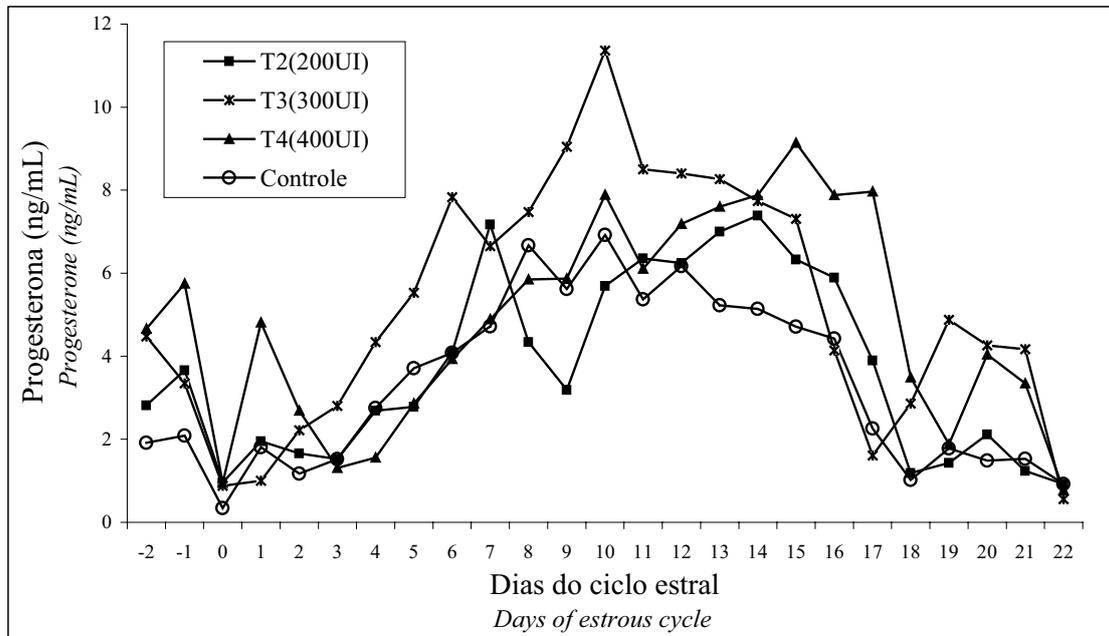


Figura 1. Concentrações plasmáticas de progesterona (médias \pm EP) em cabras tratadas com CIDR, seguido da aplicação de diferentes doses de eCG durante a estação reprodutiva.

As fêmeas sincronizadas com o CIDR + eCG em diferentes dosagens (200, 300 e 400 UI), apresentaram aumentos significativos ($P < 0,0001$) nas concentrações plasmáticas de P_4 , quando comparados àqueles dos animais controle.

Os animais do tratamento controle, apresentaram concentrações circulantes de P_4 baixas no dia 0 ($0,34 \pm 0,27$ ng/ml), confirmando o dia da ovulação, com aumentos significativos nos dias 8 ($6,67 \pm 0,27$ ng/ml), 10 ($6,92 \pm 0,27$ ng/ml) e 12 ($6,17 \pm 0,27$ ng/ml). A partir deste momento, as concentrações de P_4 começaram a diminuir gradativamente.

No primeiro dia após ovulação, as fêmeas tratadas com a maior quantidade de eCG (T4), mostraram um aumento significativo ($P < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de P_4 , diferentemente do tratamento controle (T1), com valores de $4,81 \pm 0,25$ vs $1,81 \pm 0,27$ ng/ml, respectivamente. Do mesmo modo, no segundo dia do ciclo estral, nos animais do T4 ($2,69 \pm 0,25$ ng/ml) foi reportada uma concentração de P_4 significativamente superior ($P < 0,001$) quando comparada com o tratamento controle ($1,66 \pm 0,27$ ng/ml). As concentrações dos animais do T4, também foi diferente estatisticamente ($P < 0,001$) do T3 ($2,22 \pm 0,29$ ng/ml) e do T2 ($1,66 \pm 0,22$ ng/ml) no mesmo dia.

As concentrações de P_4 foram aumentando gradativamente após o terceiro dia do ciclo estral, mostrando concentrações plasmáticas superiores ($P < 0,05$) no quarto dia, nos grupos T3 ($4,34 \pm 0,21$ ng/ml) vs T4 ($1,56 \pm 0,13$ ng/ml). Do quinto dia até o 16º não foram observadas diferenças estatísticas significativas, mesmo que o T3, tratado com as 300 UI de eCG, tenha apresentado concentrações plasmáticas de P_4 superiores quando comparado com os outros grupos experimentais. Aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona também foram observados nos mesmos períodos por Kridli & Al-Khetbi (2006) e Liu et al. (2007) pesquisando em ovelhas cíclicas.

Já no dia 17 do ciclo estral, o grupo T4, mostrou concentrações de P_4 maiores significativas ($P < 0,001$) quando comparou-se com os grupos

T1 e T3, com valores respectivos de $7,97 \pm 0,22$ vs $2,26 \pm 0,19$ vs $1,61 \pm 0,27$ ng/ml. Também foram evidenciados aumentos significativos ($P < 0,001$) no dia 18, apresentando então, os grupos T4 ($3,49 \pm 0,19$ ng/ml) e T3 ($2,86 \pm 0,27$ ng/ml) concentrações superiores quando comparadas com o tratamento controle T1 ($1,02 \pm 0,27$ ng/ml).

No final da fase lútea (Dia 19), as fêmeas ovinas do T3 apresentaram concentrações superiores de P_4 , sendo significativas ($P < 0,05$) quando comparadas com os grupos T1 e T2, mostrando então, valores de $4,88 \pm 0,27$; $1,78 \pm 0,25$, e $1,43 \pm 0,27$ ng/ml, respectivamente.

O número de corpos lúteos (CL) foi significativamente superior ($P < 0,05$) nas fêmeas caprinas injetadas com 400 UI de eCG (T4) do que naquelas tratadas com 200 UI (T2) ($4,27 \pm 0,23$ vs $1,95 \pm 0,19$; $P < 0,05$). Os animais controle (T1) e os que receberam somente 200 UI (T2) tiveram como máximo dois corpos lúteos. Entretanto, não foi observada uma quantidade diferente e significativa de CL nos grupos T3 e T4, tratados respectivamente com 300 e 400 UI de eCG. Estes dados corroboram os achados de Ritar et al. (1989) pesquisando em cabras Cashemere. Já, um número menor de CL foi achado por Liu et al. (2007) em ovelhas cíclicas utilizando 500 UI de eCG ($2,3 \pm 0,6$ /ovelha). Entretanto, Riesenberget al. (2001), utilizando doses de 1200 UI de eCG, reportaram em média $3,2 \pm 1,6$ CL/cabra utilizando o dispositivo de progesterona durante 12 dias. O aumento nas concentrações plasmáticas de P_4 nesse período, pode ser o resultado da atividade do corpo lúteo somado à atividade de folículos grandes luteinizados. Por tanto, o eCG provoca uma hiperestimulação folicular, resultando em maior tamanho do corpo lúteo, evidenciando sua atividade luteotrófica (Evans & Robinson, 1980; Barrett et al., 2004).

Os resultados estão de acordo com os achados de Pearce & Robinson (1985) trabalhando em ovelhas Merino, os quais demonstraram a existência de um incremento linear na taxa ovulatória quando aumentaram a dose de eCG (300 e 600 UI), com

elevação também nas concentrações plasmáticas de P_4 , estabelecendo, possivelmente, a existência de uma relação direta entre a dosagem de eCG, corpos lúteos, taxa ovulatória, e concentrações plasmáticas de P_4 e E_2 (Evans & Robinson, 1980). Trabalhando também em ovelhas, Barrett et al. (2004) e Uribe-Velásquez et al. (2002; 2008a) mostraram valores superiores nas concentrações de progesterona nas fêmeas ovinas submetidas à administração de 500 UI de ECG durante a estação reprodutiva.

Estes aumentos nas concentrações de progesterona em resposta à administração de eCG podem incrementar a taxa de prenhez em ovelhas (Nephew et al., 1994) e em fêmeas bovinas (Nishigai et al., 2001; Thatcher et al., 2002).

O perfil das concentrações de estradiol no plasma (Médias \pm EP) dos grupos experimentais está apresentado na Figura 2. Observou-se diferença estatística significativa nos dias ($P < 0,01$) e na interação tratamento X dia ($P < 0,001$).

As fêmeas caprinas do tratamento controle (T1) apresentaram concentrações plasmáticas de E_2 aumentadas no dia -2 antes da ovulação ($14,22 \pm 0,49$ pg/ml). Da mesma forma, também foram observados aumentos significativos ($P < 0,001$) nos dias 7 ($11,30 \pm 0,93$ pg/ml) e 19 ($13,54 \pm 0,59$ pg/ml) após ovulação. Os resultados estão próximos aos encontrados por Ravindra et al. (1994).

No sétimo dia após ovulação, as fêmeas tratadas com as maiores concentrações de eCG, T3 e T4, apresentaram aumentos significativos ($P < 0,001$) nas concentrações de E_2 , com valores respectivos de $15,05 \pm 0,86$ e $17,72 \pm 0,34$ pg/ml, quando comparados com o T1-Controle ($11,30 \pm 0,93$ pg/ml).

Do mesmo modo, no décimo dia do ciclo estral, nos animais do tratamento T4 ($17,27 \pm 0,32$ pg/ml) e T3 ($14,64 \pm 0,85$ pg/ml) verificou-se uma concentração de E_2 significativamente superior ($P < 0,01$) quando comparada com o T1-Controle ($9,22 \pm 0,48$ pg/ml).

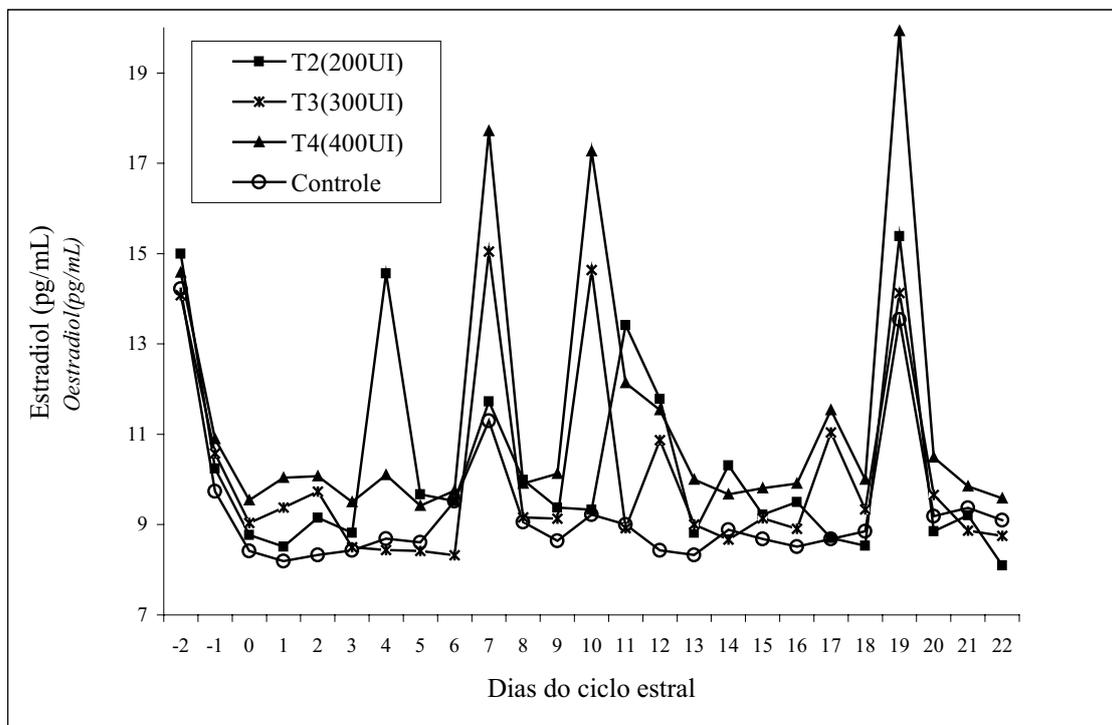


Figura 2. Concentrações plasmáticas de estradiol (médias \pm EP) em cabras tratadas com CIDR, seguido da aplicação de diferentes doses de eCG durante a estação reprodutiva.

Já, no dia 19 do ciclo estral, o grupo T4 (19,93±0,27 pg/ml) mostrou concentrações de E₂ superiores e significativas (P<0,01) quando comparadas com o tratamento controle-T1 (13,54±0,59 pg/ml), sendo que, também no mesmo dia, nos grupos tratados com 200 UI (T2) e 300 UI de eCG (T3), observaram valores superiores de E₂ quando comparados com tratamento controle, mostrando concentrações de 15,39±0,47 pg/ml para o T2 e de 14,13±0,56 pg/ml para o T3, sem diferença significativa dentro deles (T2 vs T3).

As pesquisas apontam que, cada pulso de hormônio luteinizante (LH) é seguido por um aumento nas secreções de E₂ e de androstenediona (Campbell et al., 1990), indicativo de que os folículos antrais ovinos são extremamente sensíveis às flutuações das concentrações plasmáticas de LH.

As médias foram próximas às reportadas por Pearce & Robinson (1985), que constataram, também, que a aplicação de eCG incrementa a resposta ovariana, evidenciada pela quantidade de folículos desenvolvidos. Contraditoriamente, valores para estradiol foram semelhantes em fêmeas ovinas em resposta a 500 UI de ECG durante a estação reprodutiva quando comparadas com o grupo controle.

Também foram reportados aumentos nas concentrações plasmáticas de E₂ após retirada do dispositivo contendo a P₄, no pró-estro e estro, em ovelhas Rambouillet, pesquisadas por Kouskoura et al. (1995).

A administração de eCG em novilhas, alterou a liberação de E₂, FSH e LH no décimo dia do ciclo estral, no dia da regressão luteal e no dia posterior à regressão, enquanto que as secreções de P₄ e androstenediona não tiveram mudanças significativas. Entretanto, o aumento nas concentrações plasmáticas de E₂ foi relacionado, inteiramente, com o desenvolvimento dos folículos ovulatórios (Bever et al., 1989). Estes autores apontaram que, em fêmeas ovinas sob condições fisiológicas, a secreção pulsátil de E₂ é totalmente dependente da secreção pulsátil de LH, e parece ser que, o eCG, em termos de atividade, não bloqueia a secreção endógena de LH.

As concentrações de E₂ elevaram-se depois da regressão luteal em associação com o crescimento do folículo dominante. Também foram obtidas por Scaramuzzi et al. (1993) e Schrick et al. (1993), aumentos nas concentrações de E₂ no plasma nos dias três a oito.

Ovelhas cíclicas sincronizadas com acetato de medroxyprogesterona (MAP) e 500 UI apresentaram concentrações superiores de estradiol quando comparadas com o tratamento controle (Liu et al., 2007), corroborando a presente pesquisa. O incremento da atividade esteroidogênica pode-se atribuir à longa vida meia da eCG (63 horas), assim como a sua atividade de FSH e de LH.

A manipulação hormonal da função ovariana em pequenos ruminantes pode proporcionar uma excelente oportunidade para determinar os marcadores ultra-sonográficos do *status* folicular, e, finalmente, melhorar os protocolos dos tratamentos hormonais nos animais domésticos e em humanos.

Conclusões

A sincronização do estro e ovulação em fêmeas caprinas, utilizando o CIDR durante 14 dias seguido da administração de gonadotrofina coriônica eqüina (200, 300 ou 400 UI de eCG), incrementa a quantidade de folículos recrutados, sejam eles folículos pequenos (nas ondas um e dois) ou médios (nas três ondas de crescimento folicular).

Referências Bibliográficas

- Ali, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v.72, p.33-37, 2007.
- Amorim, E.A.M.; Torres, C.A.A.; Amorim, L.S. et al. Dinâmica folicular em cabras da raça Toggenburg em lactação tratadas ou não com somatotropina bovina recombinante. **Arquivos Brasileiros de**

- Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1500-1508, 2007.
- Barret, D.M.W.; Bartlewski, P.M.; Batista-Arteaga, M. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding season in ewes. **Theriogenology**, v.61, p.311-327, 2004.
- Bevers, M.M.; Dieleman, S.J.; Van Tol, H.T.M. et al. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.745-754, 1989.
- Campbell, B.K.; Mann, G.E.; McNeilly, A.S. et al. Pulsatile secretion of inhibin, oestradiol and androstenedione by the ovary of the sheep during the oestrus cycle. **Journal of Endocrinology**, v.126, p.385-93, 1990.
- Castonguay, F.; Dufour, J.J.; Minvielle, F. et al. Follicular dynamics and dominance in Boorola x Finnish Landrace and Boorola x Suffolk ewes heterozygous for the F gene. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.193-203, 1990.
- Cline, M.A.; Ralston, J.N.; Seals, C. et al. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotrophin or P.G. 600 to estrus and ovulation in ewes. **Journal of Animal Science**, v.79, p.589-594, 2001.
- Driancourt, M.A.; Fry, R.C. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.27, p.279-292, 1992.
- Drion, P.V.; Furtoos, V.; Baril, G. et al. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.41, p.401-412, 2001.
- Evans, G.; Robinson, T.J. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. **Journal of Agricultural Science**, v.94, p.69-88, 1980.
- Fonseca, J.F.; Torres, C.A.A.; Santos, A.D.F. et al. Progesterone and behavioral features when estrous is induced in Alpine goats. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.366-373, 2008.
- Freitas, V.J.F.; Salles, M.G.F. Adaptation of eCG (equine chorionic gonadotrophin dose for estrus synchronization of dairy goats raised in Northeast Brazil: preliminary results. In: International Conference of Goats, 7, 2000, Tours. **Proceedings...** Institut de L'Élevage and INRA, 2000. p.465-466.
- Ginther, O.J.; Kot, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v.42, p.987-1001, 1994.
- Hervé, V.; Roy, F.; Bertin, J. et al. Antiequine chorionic gonadotrophin (eCG) antibodies generated in goats treated with eCG for the induction of ovulation modulate the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone bioactivities of eCG differently. **Endocrinology**, v.145, p.294-303, 2004.
- Kouskoura, T.H.; Kouimtzis, S.; Alexaki, E. et al. Comparative studies of ovarian steroids in blood, and specific proteolytic enzymes in the cervical mucus, in four sheep breeds after oestrus synchronization (Progesterone and PMSG). 1. Breed variation of oestradiol-17 β and progesterone in blood during natural oestrus, synchronization oestrus, and the first oestrus after synchronized oestrus. **Reproduction Domestic Animal**, v.30, p.8-13, 1995.
- Kridli, R.T.; Al-Khetlib, S.S. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.75-85, 2006.
- Lafrance, M.; Goff, A.K. Effect of pregnancy on oxytocin-induced release of prostaglandin F2a in heifers. **Biology of Reproduction**, v.3, p.1113-1119, 1985.
- Latour, D.; Littell, R. **Advanced general linear models with an emphasis on mixed models**. Version 6.12, Copyright by SAS Institute Inc., Cary, USA, 1996. 268p.
- Leyva, V.; Buckrell, B.C.; Walton, J.S. Regulation of follicular and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**, v.50, p.395-416, 1998.
- Liu, X.; Dai, Q.; Hart, E.J. et al. Ultrasonographic characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with medroxyprogesterone acetate (MAP)-releasing intravaginal sponges and equine chorionic gonadotrophin (eCG). **Reproduction Domestic Animal**, v.42, p.393-401, 2007.
- Martínez, J.J.; Izaguirre, F.; Sánchez, L. et al. Comportamiento reproductivo de ovejas Barbados Barriga Negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. **Revista Científica**, v.17, p.47-52, 2007.

- McGinley, R.; Casey, J.H. Analysis of progesterone in unextracted serum; a method using danazol (17 a-preg-4-en-20-yno (2,3) isoxasol-17-ol) a bloker of steroid binding to proteins. **Steroids**, v.33, p.127-138, 1979.
- Menchaca, A.; Vilariño, M.; Crispo, M. et al. Day O Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicles improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, v.68, p.1111-1117, 2007.
- Mies Filho, A.; Endler, J.O.; Dutra, J. et al. Indução do estro ovulatório em ovelhas com o emprego de estímulos elétricos e/ou hormonais - nota prévia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.13, p.229-238, 1989.
- Moor, R.M.; Osborn, J.C.; Crosby, I.M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. **Journal Reproduction of Fertility**, v.74, p.167-172, 1985.
- Nephew, K.P.; Cardenas, H.; McClure, K.E. et al. Effects of administration of human chorionic gonadotrophin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. **Journal of Animal Science**, v.47, p.283-294, 1994.
- Nishigai, M.; Takamura, A.; Kamomae, H. et al. The effect of human chorionic gonadotrophin on the development and function of bovine corpus luteum. **Journal Reproduction Development**, v.47, p.283-294, 2002.
- Noel, B.; Bister, J.L.; Pierquin, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**, v.41, p.719-727, 1994.
- Pearce, D.T.; Robinson, T.J. Plasma progesterone concentrations, ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.75, p.49-62, 1985.
- Ravindra, J.P.; Rawlings, N.C.; Evans, A.C.O. et al. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.501-509, 1994.
- Riesenberg, S.; Meinecke-Tillmann, S.; Meinecke, B. Ultrasonic survey of follicular development following superovulation with a single application of pFSH, eCG or hMG in goats. **Small Ruminant Research**, v.40, p.83-93, 2001.
- Ritar, A.J.; Salamon, S.; Ball, P.D. et al. Ovulation and fertility in goats after intravaginal device-PMSG treatment. **Small Ruminant Research**, v.2, p.323-331, 1989.
- Rubianes, E.; Castro, T.; Carbajal, B. et al. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, p.1-13, 1996.
- Scaramuzzi, R.J.; Adams, N.R.; Baird, D.T. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p.459-478, 1993.
- Schrick, F.N.; Surface, R.A.; Pritchard, J.Y. et al. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1133-1140, 1993.
- Silveira, K.B.X.; Kozicki, L.E. Superovulação em ovelhas Suffolk durante o anestro sazonal com FSH e PMSG. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v.25, n.3, 2001.
- Thatcher, W.W.; Moreira, F.; Pancarci, S.M. et al. Strategies to optimize reproductive by regulation of ovarian function. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.243-254, 2002.
- Tenório Filho, F.; Santos, M.H.B.; Carrazzoni, P.G. et al. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. **Small Ruminant Research**, v.72, p.51-56, 2007.
- Uribe-Velásquez, L.F.; Oba, E.; Lara-Herrera, L.C. et al. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2 α . **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.944-953, 2002.
- Uribe-Velásquez, L.F.; Oba, E.; Souza, M.I.L. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.40, p.83-88, 2008a.
- Uribe-Velásquez, L.F.; Oba, E.; Souza, M.I.L. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.58-65, 2008b.