



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA NA QUANTIDADE E QUALIDADE DE
OVÓCITOS OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL EM
NOVILHAS NELORE**

TIAGO OMAR DIESEL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2010**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA NA QUANTIDADE E QUALIDADE DE
OVÓCITOS OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL EM
NOVILHAS NELORE**

ALUNO: Tiago Omar Diesel

ORIENTADORA: Margot Alves Nunes Dode

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 027/2010

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2010**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DIESEL, T. O. **Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal em novilhas Nelore.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 81p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

DIESEL, T. O. **Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal em novilhas Nelore.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.

1 estimulação hormonal 2 OPU 3 quantidade e qualidade ovocitária, 4 produção *in vitro* I. Dode, M.A.N. II. Phd

CDD ou CDU
Agris/FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA NA QUANTIDADE E QUALIDADE DE
OVÓCITOS OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL EM
NOVILHAS NELORE**

TIAGO OMAR DIESEL

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADO POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA/RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA)**

(ORIENTADORA) e-mail: margot@cenargen.embrapa.br

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO) e-mail: cmlucci@unb.br**

**HÉLIO BLUME, Doutorado (UPIS)
(EXAMINADOR EXTERNO) e-mail: helio01682@upis.br**

BRASÍLIA/DF, 25 de FEVEREIRO de 2010

Dedico este trabalho a minha família, aos meus pais Omar Ivan Diesel e Marlei S. Bressan Diesel, também a minhas irmãs Franciele I. Diesel e Michele C. Diesel e minha sobrinha Laura, que apesar da distância sempre me apoiaram nesta importante conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **minha família** que sempre me apoio em todos os momentos de necessidade, superando a distância durante o curso de pós-graduação.

Aos meus orientadores, **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, e **Dr. Rodolfo Rumpf** pelos ensinamentos e pela pronta disposição com que me atenderam nos momentos de dificuldade durante todo o período de estudo e realização do projeto.

Em especial ao **Dr. Ricardo Alamino Figueiredo**, **Dr. Maurício Machaim Franco**, e **Regivaldo Vieira Souza** que nunca mediram esforços para que o projeto fosse realizado com sucesso. Aos pesquisadores, **Dr. Eduardo Melo**, **Dr. Helder Louvandine**, **Dr. Alexandre F. Ramos**, **Dr. Jairo Pereira Neves**, pela contribuição no aperfeiçoamento dos ensinamentos. E ao departamento de estatística do Cenargen na pessoa da **Joseane** e do **Rubem**, muito obrigado.

Aos graduandos, pós-graduandos e amigos pela disposição a ajudar durante os trabalhos de campo: **Heitor Teixeira**, **Michele**, **Flávia**, **Valquíria**, **Rafael**, **Ângelo**, **Alice**, **Emivaldo**, **Monique**, **Fernanda.....**, muito obrigado.

Aos pós-graduandos, **José Carvalho Filho**, **Grazieli Marinheiro**, **Nadia Simarro** e **Andrei Fidelis**, pela ajuda efetiva durante o desenvolvimento do experimento.

Aos funcionários do Campo Experimental Sucupira e do Laboratório de Reprodução Animal dos Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa, **Expedito**, **Milton**, **Manuel**, **Urias**, **Lia**, **Anita**, **Zefa**, **Normandes**, **Carlos**, **Caetano**, **Weber**, **Pelé**, **Zequinha**, **Mineiro**, **Arlindo**, **Zidane**, **Japão**, **Chicão**, **Eduardo...** sem os quais não seria possível desenvolver pesquisa a campo.

A **Universidade de Brasília (UNB)** e ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Animais (PPGCA)**, e apoio financeiro da **Embrapa/Cenargen**, **Geneal – Genética Animal**, **FUNARBE – Fundação Artur Bernardes** e **CAPES**.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 Objetivos.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Dinâmica Folicular	6
2.2 Manipulação do Ciclo Estral.....	11
2.3 Maturação Ovocitária.....	12
2.3.1 Maturação meiótica ou nuclear	13
2.3.2 Maturação citoplasmática.....	14
2.4 Competência Ovocitária	16
2.5 Produção <i>In Vitro</i> de Embriões (PIV).....	17
2.5.1 Aspiração folicular	17
2.5.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	21
2.5.3 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	23
2.5.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	25
CAPÍTULO 2	43
1 RESUMO	29
2 ABSTRACT	31
3 INTRODUÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Reagentes	35
4.2 Local	35
4.2 Animais.....	36
4.3 Produção de Embriões <i>In Vitro</i>	36
4.3.1 Recuperação de ovócitos, seleção e maturação <i>in vitro</i>	36
4.3.2 Fecundação <i>in vitro</i> e cultivo de embriões.....	38
4.3.3 Cultivo <i>in vitro</i>	39
4.3.4 Avaliação do estágio de maturação ovocitária.....	39
4.4 Delineamento Experimental	39
4.4.1 Tratamentos.....	39
4.5 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Resultados.....	43
5.2 Discussão	47
6 CONCLUSÃO.....	53
7 AGRADECIMENTOS	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA NA QUANTIDADE E QUALIDADE DE OVÓCITOS OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL EM NOVILHAS NELORE

Tiago Omar Diesel¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Médico Veterinário, Brasília-DF, Brasil., ²Médica Veterinária, PhD Brasília-DF, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal (OPU) em novilhas Nelore. Foram utilizadas 27 novilhas cíclicas da raça Nelore, sendo que todos os animais passaram pelos três tratamentos em delineamento “cross-over”. Os animais foram sincronizados e no D6 após a manifestação do cio foi realizada a ablação dos folículos ≥ 5 mm de diâmetro, com colocação de implante intravaginal de progesterona e aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$. Nos animais do grupo controle (Tc) a OPU foi realizada no D12 após estro; no grupo SOV-LH (T₁) no D8 após estro teve início a administração de FSH (162 UI-PLUSET[®]) em 6 doses decrescentes de 12 em 12 horas, e a OPU foi realizada 36 horas após a última aplicação de FSH, sendo que 6 horas antes da OPU os animais receberam uma aplicação de 25mg de LH; no grupo SOV (T₂) os animais receberam o mesmo tratamento do T₁, porém sem aplicação de LH. No momento da OPU os folículos foram contados, classificados pelo tamanho em > 6 mm e < 6 mm e aspirados separadamente de acordo com o tamanho. Os CCOs recuperados foram classificados de acordo com a qualidade morfológica (1-4) e os de qualidade grau 1,2,3 foram utilizados para a PIV. Um total de 833 ovócitos foram maturados e fecundados *in vitro*, sendo que a taxa de clivagem foi avaliada no D2 (48h após a inseminação) a taxa de blastocisto avaliada nos dias 6,7,8 e a taxa de eclosão no dia 8. Para detectar a existência de efeito do tamanho dos folículos (>6 mm e <6 mm) e tratamentos hormonais (Tc, T₁, T₂), bem como suas interações sob a taxa de ovócitos recuperados e produção de embriões foi utilizado o modelo linear generalizado misto (MLGM). Para o número de folículos aspirados, ajustou-se um modelo linear generalizado misto família quase Poisson, com função de ligação log, para

analisar a taxa de eclosão foi utilizado o modelo linear generalizado família binomial. Os resultados indicaram que o tratamento T2 ($8,5 \pm 5,5$) apresentou número médio de ovócitos recuperados maior ($P < 0,05$) do que o T1 ($7,2 \pm 4,3$) e o Tc ($6,7 \pm 4,3$). Quando as médias foram avaliadas por tamanho de folículo, foi observado número médio de ovócitos recuperados a por sessão maior ($P < 0,05$) nos folículos < 6 mm ($9,3 \pm 5,4$) em comparação aos > 6 mm ($5,7 \pm 3,2$). O número de folículos < 6 mm foi maior ($P < 0,05$) no Tc ($34,8 \pm 16,3$) em relação ao T1 ($8,5 \pm 8,6$) e T2 ($10,1 \pm 7,6$), e estes foram semelhantes ($P > 0,05$). Já para folículos > 6 mm um maior número foi observado no T1 ($23,5 \pm 11,5$) e T2 ($19,1 \pm 6,8$) em comparação ao Tc ($1,8 \pm 1,4$) ($P < 0,05$). A produção de ovócitos de qualidade I, II e III de folículos < 6 mm, foi maior no Tc em comparação aos tratamentos T1 e T2 ($P < 0,05$). Para folículos < 6 mm o T2 produziu mais ovócitos de qualidade I em média, 2,62 vezes maior ($P < 0,05$) em relação ao T1. O contrário ocorreu na produção de ovócitos de qualidade I, II e III de folículos > 6 mm onde T1 e T2 foram semelhantes, porém produziram mais ovócitos que Tc ($P < 0,05$). Os resultados mostraram que a taxa de blastocisto não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$) quando apenas os folículos menores do que 6 foram avaliados, sendo $31,2 \pm 12,2\%$, $31,0 \pm 16,9\%$ e $24,3 \pm 14,1\%$ para Tc, T1 e T2, respectivamente. Entretanto, quando o tamanho do folículo > 6 mm foi considerado, um aumento ($P < 0,05$) na taxa de blastocistos foi observada nos tratamentos T1 ($47,8 \pm 21,2\%$) e T2 ($39,1 \pm 19,8\%$) em relação ao Tc ($22,2 \pm 44,1\%$). O efeito do tratamento hormonal na produção embrionária também foi detectado quando a análise global foi realizada independente do tamanho do folículo, sendo a taxa de blastocisto maior ($P < 0,05$) no T1 ($39,4 \pm 20,5\%$) e T2 ($31,7 \pm 18,4\%$) em relação ao Tc ($26,7 \pm 31,7\%$). A taxa de eclosão foi semelhante entre todos os tratamentos considerando ou não o tamanho folicular ($P > 0,05$). A superestimulação ovariana, com ou sem aplicação de LH, aumentou a produção de embriões *in vitro* em novilhas Nelore. Portanto a aplicação de FSH na onda sincronizada para aspiração folicular pode ser uma alternativa viável para a produção comercial de embriões *in vitro*.

Palavras chaves: estimulação hormonal, *Bos indicus*, fecundação *in vitro*, produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT**EFFECT OF OVARIAN STIMULATION IN THE QUANTITY AND QUALITY OF OOCYTES OBTAINED BY OVUM PICK UP IN NELLORE HEIFERS**

Tiago Omar Diesel¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹ Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ² Veterinary, PhD Brasília-DF, Brazil.

The aim of this study was to evaluate the effect of ovarian stimulation in quantity and quality of oocytes obtained by ovum pick up (OPU) in Nellore heifers. Twenty seven Nellore cyclical heifers were used in a cross-over experimental design, where all the animals passed by each of the three treatments. All animals were sincronized and on D6 after estrus detection the ablation of follicles ≥ 5 mm in diameter was performed and the animals received an intravaginal implant of progesterone and an application of prostaglandin F_{2 α} . In the animals of the control group (Tc) the OPU was performed on D12 after estrus; in the group SOV-LH (T1) on D8 after estrus, it has started the administration of FSH (162 UI-PLUSET ®) in 6 decreasing doses of 12 to 12 hours, the OPU was performed 36 hours after the last application of FSH and, 6 hours before OPU the animals received one application of 25 mg of LH; in the group SOV (T2) the animals received the same treatment as T1, but without the application of LH. At the time of OPU follicles were counted and classified by the size in > 6 mm and <6 mm, and then were aspirated separately. The recovered COCs were classified according to morphological quality (I-IV) to quality in grade I, II, III and were used for IVP. A total of 833 oocytes were matured in vitro, cleavage rate was evaluated on D2 [48 h post insemination (pi)] and blastocyst rate on day 6, 7 and 8 pi, being the hatching rate evaluated on D8 pi. To detect effect of the follicles size (> 6 mm and <6 mm) and hormonal treatments (Tc, T1, T2) and their interactions in the rate of retrieved oocytes and embryo production the generalized linear mixed model (MLGM) with normal distribution and *log* link function was used. For the number of aspirated follicles, a generalized linear mixed model almost Poisson family was adjusted with log link function. To analyze the hatching a generalized linear model binomial

family was used. The results indicated that in T2 treatment (8.5 ± 5.5) a higher number of oocyte was recovered ($P < 0.05$) than in T1 (7.2 ± 4.3) and Tc (6.7 ± 4.3). When the means were evaluated by follicles size, it was observed a higher number of oocytes per session ($P < 0.05$) in follicles < 6 mm (9.3 ± 5.4) compared to > 6 mm (5.7 ± 3.2). The number of follicles < 6 mm was higher ($P < 0.05$) in Tc (34.8 ± 16.3) compared to T1 (8.5 ± 8.6) and T2 (10.1 ± 7.6), which were similar between them ($P > 0.05$). For follicles > 6 mm a larger number was observed in T1 (23.5 ± 11.5) and T2 (19.1 ± 6.8) compared to Tc (1.8 ± 1.4) ($P < 0.05$). On follicles < 6 mm, higher number of oocytes grade I, II and III were recovered in Tc compared to treatments T1 and T2 ($P < 0.05$). For follicles < 6 mm the T2 produced more oocytes quality I, being 2.62 times higher ($P < 0.05$) than T1. In contrast, for follicles > 6 mm number of oocytes grade I, II and III was similar between T1 and T2, but it was lower in Tc ($P < 0.05$). The results showed that the blastocyst production did not differ between treatments ($P > 0.05$) when only the follicles smaller than 6 mm were considered, being $31.2 \pm 12.2\%$, $31.0 \pm 16.9\%$ and $24.3 \pm 14.1\%$ for Tc, T1 and T3, respectively. However, when only follicle > 6 mm were considered, an increase ($P < 0.05$) in blastocyst rate was observed in T1 treatments ($47.8 \pm 21.2\%$) and in T2 ($39.1 \pm 19.8\%$) compared to Tc ($22.2 \pm 44.1\%$). The effect of hormonal treatment on blastocyst production was also detected when a global analysis was conducted independent of follicle size, being the blastocyst rate higher ($P < 0.05$) in T1 ($39.4 \pm 20.5\%$) and T2 ($31.7 \pm 18.4\%$) than in Tc ($26.7 \pm 31.7\%$). The hatched rate was similar among all treatments considering or not the follicular size ($P > 0.05$), in the general analysis the hatched rate was similar for Tc ($39.0 \pm 12.2\%$), T1 ($38.7 \pm 25.3\%$) and T2 ($35.5 \pm 24.1\%$). The ovarian stimulation, with or without application of LH, increased the in vitro production of embryos in Nellore heifers. Therefore the application of FSH in the synchronized wave for follicular aspiration may be a viable alternative to the commercial production of embryos in vitro.

Key words: hormonal stimulation, *Bos indicus*, in vitro fertilization, in vitro embryo production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema do protocolo hormonal utilizado nos grupos experimentais, tratamento controle (Tc), tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) para sincronização de cio, representando os dias (D) de aplicação e os hormônios utilizados.....40

Figura 2.2 – Esquema do protocolo hormonal utilizado nos diferentes grupos experimentais, tratamento controle (Tc), tratamento 1 (T_{FSH-LH}) e tratamento 2 (T_{FSH}) representando os dias (D) de aplicação e os hormônios utilizados.....41

Figura 2.3 - Imagem microscópica dos ovócitos corados com lacmóide (1%), mostrando a presença da Vesícula Germinativa (setas pretas), aumento de 1.000 x (Nikon Eclipse E200).45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Média do número de ovócitos recuperados por tratamento hormonal (Tc, T1, T2), e média de ovócitos recuperados de folículos maiores e menores que 6mm de diâmetro 44

Tabela 2.2 – Distribuição média do número de folículos aspirados de acordo com os tratamentos Tc, T1, T2, e tamanho dos folículos44

Tabela 2.3 – Distribuição média do número de ovócitos dos vários graus de qualidade de acordo com tratamento (Tc, T1, T2) e tamanho de folículo..... 45_Toc259046641

Tabela 2.4–Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8, nos tratamentos Tc, T1, T2 para ovócitos obtidos de folículos menores que 6 mm.....46

Tabela 2.5– Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8 nos tratamentos Tc, T1, T2, para ovócitos obtidos de folículos maiores que 6mm46

Tabela 2.6– Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8 nos tratamentos Tc, T1, T2, para ovócitos obtidos de folículos menores e maiores que 6mm47

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AFT	Aspiração folicular transvaginal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BMP 15	<i>Bone morphogenetic proteins 15</i> (proteína morfogenética óssea 15)
BSA	Albumina sérica bovina
bST	Somatotropina bovina
CCO	Complexos <i>cummulus</i> ovócito
CL	Corpo Lúteo
CSF	Fator citostático
eCG	Gonadotrofina Corionica Equina
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidermal)
FFb	Fluido folicular bovino
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF 9	<i>Growth differentiation factor-9</i> (Fator de crescimento diferencial 9)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
I.A.	Inseminação Artificial
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Fator de crescimento semelhante a insulina)
IGFBP	Proteína ligante de IGF
KL-c	Kit Ligante c
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	<i>Mitogen protein kinase k</i> (Proteína mitogênica kinase)
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOET	Múltiplas ovulações e transferência de embriões
MPF	Fator promotor de fase M
MZT	Transição materno zigótica
OPU	<i>Ovum Pick-Up</i> (Aspiração folicular transvaginal)
PI	Prófase I
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PKA	Proteína quinase A
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
SFB	Soro fetal bovino
SOF	<i>Synthetic oviductal fluid</i> (Fluído sintético do oviduto)
SSS	Soro sintético quimicamente definido
SVE	Soro de vaca em estro
TCM	Meio de cultivo celular
TE	Transferência de embriões
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de crescimento e transformação beta)
TZP	Processos citoplasmáticos trans-zonais

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil ocupa um lugar de destaque na pecuária mundial, sendo que a bovinocultura apresenta uma população de 211.420.012 de cabeças (IBGE, 2008). Além de possuir o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, o país se tornou o maior exportador mundial de carne. Porém a concorrência pelo mercado externo obriga a oferta de produtos a baixo custo. Portanto, o Brasil deverá, em um curto período de tempo, produzir mais carne em uma área menor com um menor custo de produção. Isso só poderá ser realizado com um aumento na produtividade do rebanho, sendo que a eficiência reprodutiva tem um papel fundamental neste contexto (Fernandes & Figueiredo 2007).

A utilização de biotecnologias reprodutivas na produção animal, tais como a transferência de embriões (TE) e a aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (PIV), possibilita aumentar o número de nascimentos por doadora de alto mérito genético, permitindo reduzir o intervalo entre gerações, que é um fator importante para a melhoria dos rebanhos (Yang et al., 1998), elevando o ganho genético anual de 2%, obtido com a inseminação artificial, para aproximadamente 2,5% (Vishwanath, 2003).

Dados referentes à produção e transferência de embriões bovinos no mundo em 2007, apresentados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões no final de 2008 (Thibier, 2008), mostram que o Brasil apresentou uma produção de 57.368 embriões *in vivo* (9,9% do total mundial) e 212.441 embriões *in vitro*

(86,6% do total mundial), sendo responsável por 32,8% do total de embriões produzidos (269.809 embriões).

O Brasil é conhecido mundialmente por sua tradição na criação de raças zebuínas, devido à sua adaptação a ambientes tropicais. As raças zebuínas ainda respondem pela maioria absoluta, cerca de 94,0% dos embriões PIV produzidos no Brasil (Viana, 2009). Apesar desta elevada produção anual a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto dificilmente é superior a 40% (Lonergan & Fair, 2008). Portanto, os resultados de conversão ovócito/embriões provenientes de aspiração folicular na PIV ainda são baixos.

Quando ovócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* são comparados aparentemente não existe diferença na maturação nuclear, nas taxas de fecundação e clivagem (Leemput et al., 1996), entretanto uma significativa diferença é observada na competência para a produção de blastocistos entre esses ovócitos (Sirard et al., 1999). Isto sugere que existem diferenças na maturação citoplasmática entre esses ovócitos (Sirard et al., 1999), e que essa é uma das etapas mais cruciais no processo de PIV (Yang et al., 1998).

Os eventos *in vivo* que determinam a correta maturação do ovócito e ocorrem sob o efeito do pico pré-ovulatório de LH, que por sua vez é a finalização de um longo processo preparatório para a fecundação (Hyttel et al., 1986). Sem dúvida, muitos fatores biológicos agem em conjunto para preparar o ovócito imaturo para que esse seja competente para ter um desenvolvimento embrionário adequado após a fecundação (Yang et al., 1998).

O folículo de origem do ovócito recuperado parece ser um fator determinante na obtenção de ovócitos com maior capacidade de produzir blastocistos morfolologicamente saudáveis, o que está normalmente associado com maiores taxas de prenhes (Sirard et al., 2006). Isso permite supor que a competência pode ser adquirida em condições foliculares específicas.

De fato, estudos indicam que a indução da diferenciação folicular pela manipulação do protocolo de estimulação ovariana, como por exemplo, uma privação de FSH ou “Coasting”, após o tratamento superestimulatório resultou na recuperação de ovócitos mais competentes, sendo, a maioria, capaz de se desenvolver até o estágio de blastocisto (Blondin et al., 2002). Esse período de privação de FSH induziria um início de

atresia que enviaria um sinal para que o ovócito adquirisse a competência. (Sirard et al., 2006).

Atualmente muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de maximizar a produção *in vitro* pela melhoria nas taxas de produção e qualidade de embriões. Para isto muitos protocolos com diferentes hormônios e tempos têm sido amplamente explorados utilizando FSH (Bungartz et al., 1995; Goodhand et al., 1999; Sirard et al., 1999; Goodhand et al., 2000; Reis et al., 2002; Roth et al., 2002; Blondin et al. 2002; Berlinguera et al., 2004; Chaubal et al., 2006; Chaubal, et al., 2007; De Roover et al., 2008; Sendag et al., 2008; Monteiro, et al., 2009), com bST (Bols et al., 1998; Roth et al., 2002), com eCG. (Van De Leemput, et al., 1999; Sendag et al., 2008), entre outros. Apesar disso, existe grande variação nos resultados, devido a vários fatores tais como diferença entre raças e período do ciclo quando da administração do tratamento.

Portanto, ainda não se tem um protocolo estabelecido para a obtenção de ovócitos mais competentes, principalmente nas raças zebuínas. Sendo assim, mais estudos são necessários para se determinar a melhor estratégia para aumentar a quantidade e qualidade dos ovócitos a serem utilizados para a PIV melhorando a eficiência dessa técnica. Sendo a manipulação do ambiente folicular antes da retirada dos ovócitos uma alternativa para aumentar o número e qualidade dos ovócitos obtidos na OPU.

1.2 Objetivos

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da estimulação ovariana, seguido por um período de restrição de FSH, em novilhas Nelore antes da aspiração folicular transvaginal, sobre o número e qualidade dos ovócitos recuperados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dinâmica Folicular

O folículo ovariano é a unidade funcional do ovário, e consiste do ovócito e suas células somáticas associadas. O pool de folículos no ovário é composto principalmente de folículos primordiais dormentes, que contêm um ovócito retido na fase diplóteno da meiose I rodeado por uma única camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa e uma membrana basal (McGee & Hsueh, 2000).

Os folículos primordiais representam o pool de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 90 a 95 % da população folicular existente nos ovários. O crescimento folicular ocorre em um grupo de folículos que formam um pool, portanto a ativação dos folículos primordiais é caracterizada pela passagem do pool de folículos quiescentes de reserva, para o pool de folículos em fase de crescimento. A primeira indicação de que o folículo começa a crescer é a mudança nas células epiteliais que se tornam cubóides, e aumentam em número por mitose, e os folículos, passam então a serem chamados de folículos primários. Esses se caracterizam por apresentarem o ovócito rodeado de uma camada de células cúbicas. Com a proliferação dessas células se formam os folículos secundários, que por sua vez se caracterizam pela presença do ovócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa, pela presença da zona pelúcida e pelo início da formação da teca. Com o crescimento folicular as células da granulosa secretam um líquido que se acumula nos espaços intercelulares separando as

células em duas populações murais e do cumulus, formando o antro. Com o aparecimento da cavidade antral o folículo passa a ser considerado terciário ou folículo de Graaf (Rajkovic, 2006). Os folículos terciários são constituídos do ovócito circundado pelas células do cumulus, uma cavidade contendo o líquido folicular, uma membrana basal e duas camadas de células tecais. O folículo de Graaf representa o estágio final do desenvolvimento folicular, apresentando todos os componentes presentes no folículo terciário e grande quantidade de líquido folicular.

O crescimento folicular é caracterizado pela presença de ondas, com início em diferentes épocas durante o ciclo estral. Na fase pré-antral, a regulação local é predominante, destacando-se o papel ativo do ovócito e sua interação com as células da granulosa mediada pelo KL-c, BPM-15 e GDF-9 (Buratini, 2007). Peptídeos intra-ovarianos como o IGF-2, as IGFbps e os FGFs participam de mecanismos de controle que determinam o recrutamento e seleção de folículos pré-antrais (Buratini, 2007).

No início do recrutamento folicular da fase antral, os níveis de GnRH secretados pelo hipotálamo estimulam as células gonadotróficas da hipófise anterior para sintetizar e secretar hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (Hafez et al., 2004). O ovócito continua a crescer desde a ativação dos folículos pré-antrais até os folículos atingirem cerca de 3,0 mm de diâmetro, após esse tamanho folicular não é mais observado aumento do tamanho ovocitário (Caixeta et al., 2009), e apenas o folículo cresce até chegar ao estágio pré-ovulatório.

Após a puberdade, com a alteração nos padrões de produção do FSH e LH os folículos antrais podem crescer até o estágio pré-ovulatório. Com a progressão do crescimento do pool folicular ocorre o desvio folicular e o estabelecimento da dominância com mudança dos padrões de liberação hormonal.

Nas espécies monovulares, todos os folículos antrais de uma onda inicial de crescimento são semelhantes, isso termina com um fenômeno chamado desvio (Ginther et al., 2001), pois durante cada onda, do pool de folículos em desenvolvimento um é selecionado, torna-se maior e passar a "dominar" os demais (Sirois et al., 1988). A partir da fase antral quando os folículos têm em torno de 3 mm de diâmetro se tornam dependentes do suporte gonadotrófico (Buratini, 2007), sendo que o pico de FSH é o principal fator responsável pelo crescimento desses folículos até ocorrer o desvio.

Antes de ocorrer o desvio todos os folículos em crescimento são capazes de se tornarem dominante, o que pode ser observado quando FSH exógeno é

administrado no início da onda estimulando muitos folículos para atingirem o diâmetro dos folículos dominantes (Adams et al., 1993), ou quando o folículo dominante é destruído (Ko et al., 1991; Ginther et al., 2002).

Durante o período de recrutamento os baixos níveis circulantes de LH no início da onda induzem a expressão de 17 α -hydroxylase/C17-20-liase (CYP17) nos folículos em crescimento, e há biosíntese de andrógenos nas células da teca e expressão de receptor de lipoproteína de baixa densidade (que fornecem colesterol para a biosíntese de esteróides). A produção aumentada de andrógenos fornece o substrato para aromatase, permitindo que as células da granulosa sintetizem estrógeno (Dunn & Mayo, 2006).

O aumento nos níveis de estradiol altera o padrão de secreção de GnRH, pois ocorre a produção de substâncias que influenciam diretamente o desenvolvimento folicular como o caso da inibina, a ativina, e a folistatina (um regulador negativo da ativina), (Rajkovic, 2006), suprimindo a secreção de FSH pela hipófise anterior.

Aparentemente, a supressão de FSH é o fator responsável pelo mecanismo que provoca o desvio das taxas de crescimento entre os folículos dominantes e subordinados. O folículo dominante continua a crescer por uma mudança na dependência de FSH para LH, e pela capacidade de melhor resposta para baixos níveis de FSH circulantes (Xu et al., 1995). Em contraste, os folículos subordinados são FSH-dependentes e, portanto, sendo privados de FSH iniciam o processo de atresia. O FSH atinge níveis basais no dia do início do desvio, e se mantém baixo pelos próximos 3 ou 4 dias até o surgimento de um novo pico. Um novo aumento de FSH no início da onda seguinte pode ser atribuído à perda do efeito de substâncias inibidoras secretadas pelo folículo dominante.

Segundo Ginther et al. (1997) o folículo que se tornou dominante é o folículo de maior tamanho no momento do desvio. Os principais mecanismos celulares responsáveis pelo desvio provavelmente, envolvem alterações na expressão da enzima aromatase (FSH / AMPc dependente) e mudanças na regulação da transcrição de receptores de LH nas células da granulosa e nas células da teca, quando o futuro folículo dominante atinge 8-9 mm de diâmetro. Assim, o primeiro folículo a chegar a uma fase decisiva em que os receptores de LH nas células da granulosa são expressos, este pode ser o folículo que se torna dominante (Ginther et al., 1996). Pois em bovinos, as concentrações de LH são transitoriamente maiores durante o desvio, e há um aumento da diferenças entre os dois maiores folículos na expressão mRNA do receptor LH na

granulosa (Xu et al., 1995). Essa diferença entre os dois folículos já ocorre 8 h antes que uma diferença no diâmetro entre eles seja observada (Beg et al., 2001).

Quando durante o ciclo os níveis de progesterona baixam devido a luteólise, os folículos dominantes, que expressam receptores de LH e são expostos à níveis crescentes dessa gonadotrofina, continuam seu crescimento até a ovulação. O pico pré-ovulatório de LH impulsionado pela liberação de GnRH induz a ovulação e diferenciação das células da teca e granulosa em células lúteas, e desencadeia a maturação final dos ovócitos (Dunn & Mayo, 2006), que progridem até a metáfase II (Hafez et al., 2004).

Dependendo se a fase de dominância está associada à presença ou não de progesterona e/ ou de um corpo lúteo (Sirois et al., 1988), o folículo vai se tornar atrésico (folículo dominante não-ovulatório). Isso porque a progesterona presente na fase lútea é um potente supressor da secreção pulsátil de LH por modular os neurônios secretores de GnRH (Herbison, 2006). Embora muitos folículos sejam recrutados para iniciar o desenvolvimento, em geral apenas um chega à fase de Graaf e irá ovular (McGee & Hsueh, 2000). Com a regressão do folículo dominante não ovulatório ocorre queda nos níveis circulantes de fatores inibitórios do FSH, ocorrendo o reinício de uma nova onda folicular.

Apesar da dinâmica folicular ser semelhante, para cada espécie, existe diferenças inter-raciais importantes no que se refere, por exemplo, ao número de ondas durante o ciclo estral, intervalo inter-ovulatório, tempo de apresentação de sinais de estro, e intervalo estro/ovulação. Em fêmeas da raça Nelore, Figueiredo et al. (1997) observaram a predominância de duas ondas foliculares em vacas (83,3%, $P < 0.05$) e três ondas em novilhas (64,7%, $P < 0.05$), sendo que apenas 30% mostraram uma variação no número de ondas entre ciclos. Viana et al. (2000) trabalhando com zebuínos da raça Gir observaram ciclos com duas (6,67%), três (60,00%), quatro (26,67%) e cinco (6,67%) ondas de crescimento folicular. Já novilhas mestiças Holandês-Zebu em geral apresentam duas ou três ondas de crescimento folicular. A frequência de ciclos estrais com uma e quatro ondas foliculares também é baixa em outros animais cruzados (Borges et al., 2001).

Além do número de ondas, outra diferença observada entre bovinos *B. Taurus* e *B. indicus* é o diâmetro máximo do folículo dominante, sendo cerca de 11 mm em Nelore (Figueiredo et al., 1997) e de 16 mm em Holandês (Ginther et al., 1996). O

menor diâmetro do folículo dominante e do CL observado em zebuínos quando comparado com taurinos, provavelmente se deve a uma menor capacidade de secreção de LH (Bó et al., 2003) e a uma menor taxa de crescimento folicular (Figueiredo et al., 1997).

O intervalo inter-ovulatório em Nelore com duas ondas (20,6 d \pm 0,5) foi menor do que o intervalo de três ondas (22,0 d \pm 0,4) (Figueiredo et al., 1997). Em zebuínos da raça Gir, Viana et al. (2000) encontraram para ciclos com três ou quatro ondas de crescimento o intervalo inter-ovulatório de 21,11 \pm 1,76 e 22,25 \pm 1,71 dias, respectivamente.

A duração do ciclo estral em Nelore é de aproximadamente 10 h, e o intervalo do estro à ovulação é de aproximadamente 26-27 h (Pinheiro et al., 1998; Bó et al., 2003). Além disso, a duração do estro é mais curta quando comparado com os animais de raças européias, havendo também uma maior incidência de estro durante a noite.

Quando fêmeas Nelore foram comparadas com fêmeas da raça Holandesa foi observado que a emergência da primeira onda pós-ovulatória do ciclo estral ocorre 0,9 d pós-ovulação (aproximadamente 1 d mais tarde em Holandês), o desvio ocorre 2,6 d após a ovulação (comparável ao Holandês), a taxa de crescimento do maior folículo durante o desvio é de 1,4 mm / dia semelhante ao holandês. O diâmetro do maior folículo no início do desvio é 5,9 mm (cerca de 2 mm menor do que na raça Holandesa) (Sartorelli et al., 2005).

Estudos realizados para determinar o diâmetro no qual o folículo dominante adquire a capacidade de ovular em resposta ao tratamento com LHp, em novilhas Nelore demonstraram que o início da capacidade ovulatória do folículo dominante ocorre entre 7 e 8,4 mm (30%), e houve um aumento linear na resposta quando atinge 8,5-10 mm (80,0%) (Gimenes et al., 2005). Em novilhas com folículos > 10 mm, 90% ovularam em resposta ao tratamento LHp. Estes resultados diferem daqueles relatados em vacas da raça Holandesa em que a capacidade ovulatória teve início em folículos \geq 10 mm de diâmetro (Sartori et al., 2001).

2.2 Manipulação do Ciclo Estral

Existem várias alternativas para o controle do desenvolvimento folicular em bovinos taurinos que também têm sido aplicados com sucesso nos zebuínos. Sendo que, a emergência e o desenvolvimento da onda folicular podem ser alterados por processos mecânicos ou tratamentos hormonais (Buratini et al., 2000)

Em algumas doadoras, onde o número de folículos maiores é muito baixo, o crescimento folicular pode ser estimulado por combinações de FSH / LH, além de gonadotrofina sérica de égua prenhe (eCG), que são hormônios conhecidos e amplamente utilizados na transferência de embriões clássica (TE). No entanto, modificações na dose, esquemas de administração ou momento da aplicação do tratamento são muitas vezes necessários, para atingir o objetivo final de estimulação antes da OPU, que é gerar uma maior quantidade folículos disponível para a aspiração (De Roover et al., 2008). O efeito da administração de FSH aumentou o número de folículos aspirados e ovócitos recuperados de categoria 1, e também maiores números de embriões transferíveis foram produzidos quando doses múltiplas de FSH foram administradas em doadoras cruzadas (Goodhand et al., 2000). Esses resultados mostraram que o tratamento com FSH administrado em doses múltiplas antes da aspiração melhora o número de folículos disponíveis para aspiração, folículos aspirados, o número e a qualidade dos ovócitos recuperados e, embriões produzidos (Goodhand et al., 2000).

A resposta à superestimulação varia de acordo com o animal. De Roover et al. (2005), quando trataram doadoras com FSHp observaram uma resposta exacerbada para número de folículos e de CCOs recuperados em 9% das sessões de OPU (59/665). Em contraste, uma baixa resposta para ambos, folículos disponíveis e CCOs recuperados, também ocorreu em 9% das sessões de OPU (61/665). Portanto, esses autores mostraram que a resposta baixa ocorre em proporções menores que as esperadas quando se trabalha com a TE convencional, considerando que nesse caso cerca de 20- 30% das doadoras não respondem à superestimulação e não produzem embriões (Martins et al., 2005).

As respostas para superestimulação folicular com gonadotrofina são ideais quando o tratamento é iniciado na emergência de uma nova onda folicular. Nesta situação, os folículos são relativamente pequenos no início da estimulação e, portanto,

podem necessitar de um tempo adicional para concluir a maturação antes da exposição ao pico de LH (D'Occhio et al., 1999).

Estudos indicam que o potencial intrínseco de um animal para produzir um número reduzido ou elevado de ovócitos é influenciado principalmente pelo pool de folículos menores que 5 mm no momento da ablação do folículo dominante (Durocher et al., 2006).

Dados sugerem que animais diferentes reagem de forma diferente para a mesma quantidade de FSH aplicada. Os animais com baixo número de folículos tendem a desenvolver folículos maiores em comparação aos animais com elevado número de folículos (De Roover et al., 2005).

A ausência de um folículo dominante no início do tratamento aumenta a eficácia dos tratamentos superestimulatórios (Adams, 1994; Mapletoft et al., 2002). A onda de desenvolvimento folicular em bovinos pode ser controlada mecanicamente por ablação do folículo com auxílio da ultra-sonografia, ou quimicamente pelos tratamentos com GnRH ou estradiol e progesterona em combinação (Bó et al., 2003).

Um procedimento comumente utilizado quando se manipula o ciclo estral para a realização de OPU-FIV é a aspiração do folículo dominante (De Roover et al., 2008) ≥ 6 mm (Barros et al., 2006; Monteiro et al., 2009), ≥ 5 (Hendriksen et al., 2004.), ou em torno do 5^o dia após a ovulação em novilhas Nelore (Buratini et al., 2000). Assim, um folículo que está destinado a regredir, muda seu curso no prazo de 12 horas após a remoção do futuro folículo dominante (Beg et al., 2002). Porém, Buratini et al., (2000) observaram o surgimento de uma nova onda folicular síncrona em $1,9 \pm 0,1$ dias após a ablação folicular em D 5 em novilhas Nelore.

2.3 Maturação Ovocitária

A ovogênese é caracterizada por um processo de divisão celular chamado meiose, cujo objetivo é a produção de células haplóides altamente especializadas. A meiose consiste de duas divisões celulares sucessivas que ocorrem após uma única replicação de DNA. Na maioria dos mamíferos os ovócitos entram em meiose durante a vida fetal e são retidos em prófase da primeira divisão, estágio em que permanecem até a

retomada meiótica, após o pico de LH (Rajkovic, 2006). Os ovócitos retidos em prófase apresentam um núcleo proeminente chamado vesícula germinativa (VG), que contém cromatina descondensada e transcricionalmente ativa (Voronina & Wessel, 2003) e que caracteriza um ovócito imaturo.

Em resposta a um estímulo, a meiose é retomada e se caracteriza pela quebra da vesícula germinativa (GVBD), e progressão para o estágio de metáfase I, anáfase I, telófase I e metáfase II. A retomada da meiose requer a presença de fator promotor de maturação (MPF) ativo, que é composto da Kinase P34CDC2 e da ciclina B1. O MPF é um fator universal não-específico responsável pela transição de fase do ciclo celular de G2 para fase M tanto em células meióticas como mitóticas (Parrish et al., 1992).

A maturação dos ovócitos é geralmente definida como o período de progressão da primeira para a segunda retenção meiótica envolvendo modificações nucleares e citoplasmáticas (Parrish et al., 1992; Eppig, 1996). O processo final de capacitação do ovócito *in vivo* tem duração, aproximadamente de 5 dias que é quando o folículo cresce de 4 para 15 mm e se torna dominante, pronto para ser fecundado e desenvolver um embrião (Pavlok et al., 1992).

Maturação nuclear se refere à GVBD, e nova retenção no estágio de metáfase II, sendo caracterizada pela presença do primeiro corpúsculo polar. A maturação citoplasmática é um processo mais complexo e envolve várias mudanças em vários processos tais como no perfil de expressão de proteínas do controle do ciclo celular (Whitaker, 1996), deslocamento de organelas, modificações transcricionais de mRNA, modificação da permeabilidade da membrana plasmática, e a diferenciação da maquinaria de sinalização de cálcio (Machaca, 2004). Alguns autores citam a maturação molecular, que apesar de estar associada à citoplasmática, devido a sua complexidade pode ser tratada separadamente.

2.3.1 Maturação meiótica ou nuclear

A maturação meiótica é a cascata de eventos nucleares que ocorrem quando o ovócito é estimulado pelo LH pré-ovulatório, ou pela remoção do ovócito de

seu ambiente folicular (Sirard, 2001). Quando a retomada da meiose é estimulada, o MPF é ativado, e o ovócito completa a primeira divisão meiótica com extrusão do primeiro corpúsculo polar, chegando a metáfase da segunda divisão onde ocorre um novo bloqueio, sob a influência do fator citostático (CSF) (Sirard, 2001).

2.3.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática é frequentemente definida como as mudanças necessárias para que o ovócito seja capaz de dar origem a um embrião após a fecundação. Entretanto, a maturação citoplasmática não é tão evidente como a maturação nuclear, uma vez que abrange eventos visíveis e invisíveis ao microscópio (Hyttel et al., 1989). Alguns aspectos da maturação citoplasmática são observados em análises ultra-estruturais um pouco antes do pico de LH, quando os ovócitos aguardam o sinal de ovulação. A primeira evidência desse processo ocorre quando o ovócito entra na fase de preparação (RNA e síntese de proteínas) (Hyttel et al., 1989). Uma segunda série de mudanças ocorre após o pico de LH que resulta em uma re-distribuição de organelas como as mitocôndrias e os grânulos corticais (Assey et al., 1994; Sirard, 2001).

A ativação de determinadas vias metabólicas envolvidas na síntese de proteínas e de fosforilação, é indispensável para a maturação citoplasmática. Dentro deste contexto, as mitocôndrias têm um papel extremamente importante uma vez que são responsáveis pelo fornecimento de energia que é consumida durante o processo de maturação. O movimento de mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é crucial para os ovócitos e blastômeros de embriões durante períodos críticos do ciclo celular. Durante o período de maturação, as mitocôndrias sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas que, por sua vez, tem papel fundamental no desenvolvimento subsequente do embrião (Krisher & Bavister, 1998).

A migração dos grânulos corticais para a periferia do ovócito também é um componente chave da maturação. Os grânulos corticais são organelas exclusivamente encontradas em ovócitos e sua composição inclui uma população diversa de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos. A exocitose de grânulos corticais (reação cortical) é um dos mecanismos mais comuns usados pelos ovócitos para evitar polispermia. A liberação do conteúdo dos grânulos corticais para a superfície exterior do

ovócito ocorre após a ativação dos mesmos que é desencadeada pela liberação de cálcio em resposta à entrada do espermatozóide no oolema (Haley & Wessel, 2004).

A produção e armazenamento de informações essenciais ao desenvolvimento futuro do embrião deve ocorrer antes da retomada da meiose. Pois quando os cromossomos são os sujeitos de transformação, a informação genética deve ser armazenada com antecedência, porque as instruções nucleares, sob a forma de mRNA, provenientes do cromossomos são silenciadas no reinício da meiose. Os ovócitos, portanto, devem ter um sistema único de acumular informações (mRNA) devido a lentidão do processo meiótico e também porque a última parte desse processo ocorre com os cromossomos totalmente condensados (Sommerville & Lodomery, 1996).

De fato, durante o seu crescimento o ovócito tem alto grau de atividade transcricional, o que faz com que acumule mRNA de origem materna, os quais são necessários não só para o crescimento e maturação mas, especialmente, para o desenvolvimento embrionário inicial (Song & Wessel, 2005). Em mamíferos superiores, o ovócito precisa acumular, durante a foliculogênese, todos os fatores maternos necessário para sustentar a maturação e o desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário. A formação desse estoque (pool) de mRNA e proteínas de origem materna que conferem ao ovócito o programa molecular necessário para a transição materno zigótica, se refere à maturação molecular.

Além desse acúmulo que ocorre durante o crescimento do ovócito, acredita-se que mRNAs específicos, e eventualmente, algumas proteínas são produzidas e adicionadas a esse estoque poucos dias antes da ovulação. Instruções especiais, provenientes de um ambiente folicular específico, são essenciais para que o ovócito possa ativar o genoma embrionário e se desenvolver até o estágio de blastocisto. Portanto, a maturação molecular representa a associação mais próxima com a competência ovocitária.

Em comparação com a situação *in vivo*, a recuperação de ovócitos de folículos pequenos e médios para a maturação *in vitro* por um período de 24 h é completamente artificial. Assim, o período de dominância folicular é ignorado durante esse procedimento. Quando considerados em conjunto, os dados ultra-estruturais e funcionais indicam claramente que o ovócito sofre modulações significativas no folículo dominante, que desempenham um papel fundamental na aquisição de competência para o desenvolvimento.

2.4 Competência Ovocitária

O conceito de competência do ovócito se refere a sua capacidade de ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário normal. Nos bovinos, o tamanho do ovócito continua a aumentar durante o desenvolvimento de folículos antrais, um ovócito deve chegar a um diâmetro crítico de 110 μm para adquirir a competência meiótica (Fair et al., 1995). No entanto Otoi et al. (1997), observaram que apesar dos ovócitos bovinos adquirirem a competência meiótica com um diâmetro de 115 μm , a plena competência para o desenvolvimento só ocorre quando atingem um diâmetro de 120 μm .

Além do tamanho do ovócito, existe uma correlação evidente entre o tamanho dos folículos e a competência dos ovócitos. Ovócitos provenientes de folículos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento do que os provenientes de folículos de menor diâmetro (Caixeta et al., 2009). Essa relação já foi demonstrada por diversos autores e, apesar de ser um fator importante, não é o único fator determinante na aquisição da competência.

Ovócitos coletados em diferentes momentos após o pico de LH possuem um alto grau de competência para alcançar o estágio de blastocisto (Sirard 2001; Duranthon & Renard, 2001). No entanto, folículos subordinados também contêm ovócitos com potencial de desenvolvimento relativamente elevado, medido pela taxa de blastocisto (Ginther et al., 2000). Esta situação é potencialmente explicada por semelhanças entre a maturação do folículo dominante e a fase inicial de atresia folicular, que enviaria ao ovócito sinais semelhante aos enviados no início da maturação (Sirard et al., 1999). Concordando com essa hipótese, Li et al. (2009), demonstraram que o início da apoptose em ovócitos imaturos é benéfico para a competência de desenvolvimento do embrião pós fecundação.

A capacidade de desenvolvimento durante a primeira semana do embrião é claramente influenciada pelo status folicular a partir do qual o ovócito é obtido, indicando que este potencial de desenvolvimento é inerente a determinadas condições específicas de maturação. Como a maioria dos embriões bovinos que não atinge o estágio de blastocisto é bloqueada na fase de transição materna zigóticos (MZT), no estágio de oito a dezesseis células, pode-se especular que ovócitos incompetentes não conseguem ativar adequadamente o genoma embrionário (Barnes citado em Sirard 2001).

2.5 Produção *In Vitro* de Embriões (PIV)

A PIV compreende um conjunto básico de tecnologias de reprodução que envolve a obtenção de ovócitos imaturos de folículos ovarianos, maturação *in vitro* de ovócitos, fecundação *in vitro*, e o cultivo *in vitro* de embriões (Kane, 2003).

2.5.1 Aspiração folicular

A técnica para a coleta repetida de ovócitos bovinos por aspiração transvaginal guiada por ultra-som foi descrita em 1988 (Pieterse et al., 1988). A aspiração folicular associada à PIV de doadoras vivas é uma técnica extremamente versátil porque pode ser aplicada a doadoras de todas as idades, desde bezerras de dois meses de idade à vacas muito velhas. Além disso, essa técnica pode ser usada em doadoras secas, em lactação e/ou prenhes até o terceiro ou quarto mês de gestação. Seu uso, entretanto, não é indicado para animais após o terceiro ou quarto mês de prenhes, animais com hipoplasia ovárica grave e animais no pós-parto imediato, ou seja, antes da atividade ovariana ser restaurada.

Apesar do custo da tecnologia ainda ser alto o seu uso é plenamente justificado quando se deseja obter o maior número possível de animais valiosos (Galli et al., 2001) ou em casos especiais tais como para obtenção de ovócitos competentes de alguma raça de gado na Índia, onde o abate de vacas não é permitido por razões religiosas (Manik et al., 2003), ou também para obtenção de produtos de animais em perigo de extinção.

Para a obtenção de ovócitos algumas técnicas de aspiração folicular podem ser utilizadas como a aspiração folicular por laparoscopia e aspiração folicular guiada por ultrasonografia. No entanto, a OPU é o método mais eficaz para a recuperação de CCOs imaturos de boa qualidade, resultando em um maior número de embriões após MIV, FIV e CIV (Becker et al., 1996; Santl et al., 1998). Sendo que a aspiração folicular por laparoscopia é empregada em casos especiais como no caso de animais muito jovens.

Santl et al. (1998) trabalhando com novilhas Simental encontraram uma proporção de ovócitos Classe I ($P < 0,001$) mais elevada após OPU do que na aspiração

folicular por laparoscopia (38,7% vs 21,0%). Essa diferença na qualidade do ovócito se refletiu após MIV / FIV, pela taxa de clivagem 58,1% vs 52,1%; ($P < 0,05$) e a taxa de desenvolvimento para mórulas e blastocistos 27,1% vs 13,9% para OPU e aspiração folicular por laparoscopia respectivamente.

Outro fator importante no resultado da OPU-PIV segundo Merton, et al. (2009) é a influência genética da doadora. Estimativas de herdabilidade foram encontradas para quantidade de CCOs e para o número de embriões produzidos. Herdabilidade para morfologia, bem como para fatores intrínsecos de competência ovocitária foram menores, mas ainda presentes.

Quanto aos equipamentos utilizados, um fator fundamental para a realização da OPU é a sonda utilizada. A sonda matriz linear parece ser menos adequada para a visualização de folículos pequenos e tem um alcance limitado para a manipulação dos ovários, mas ela pode ser usada para o padrão de exames de ultrassom trans retal em várias espécies. As taxas de recuperação de ovócitos são semelhantes quando se utiliza o transdutor linear e setorial. Bols et al. (2004), recomendam o transdutor setorial para procedimentos de OPU de rotina devido à sua maior área de digitalização e capacidade de detectar mais folículos pequenos. A probe de 7.5 Mhz é superior à probe de 5 Mhz para a coleta de ovócitos bovinos por aspiração folicular transvaginal, não há diferença na visualização de folículos de 3-5mm e 6-10 mm entre as duas freqüências. Entretanto, a visão do número total de folículos é aumentado na probe de 7.5 Mhz.

A agulha utilizada também tem influência direta nos resultados da OPU. As maiores taxas de recuperação de ovócitos são obtidas quando se utiliza a agulha de 18-G, independente da pressão de vácuo (Bols et al., 1996). Mas segundo Fry et al. (1997), a aspiração de ovócitos bovinos imaturos é mais fácil e mais bem sucedida quando agulha 17-G único lúmen é utilizada associada à uma pressão de vácuo de 55 mmHg. Resultados mostram que uma simples mudança de diâmetro da agulha pode triplicar a quantidade real de líquido aspirado, quando a mesma pressão é utilizada. Por exemplo, 38,8 ml de água/min usando uma agulha 18-G correspondem a 26,8 ml de água/min utilizando uma agulha 19-G, e apenas 13,8 ml de água/min usando uma agulha 21-G (Bols et al., 1996).

A pressão de vácuo utilizada durante a OPU tem uma influência significativa na qualidade morfológica dos ovócitos recuperados. Ward et al. (2000), utilizando diferentes pressões de vácuo (30, 50, 70 e 90 mm Hg) para aspirar 4156

folículos bovinos, avaliaram seu efeito na taxa de fluxo de aspiração, recuperação, morfologia e formação de blastocistos *in vitro* dos ovócitos recuperados. Esses autores encontraram que a taxa de recuperação aumentou com a pressão de aspiração acima de 50 mm Hg ($P < 0,05$), porém a taxa de recuperação de ovócitos de grau 1 diminuiu ($P < 0,05$) aumentando a quantidade de ovócitos desnudados ($P < 0,05$). Da mesma forma, o desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi menor com o aumento da pressão de aspiração, acima de 50 mm Hg ($P < 0,05$) (Ward et al., 2000). Na pressão de aspiração baixa, a maioria dos ovócitos recuperados é circundada por um cumulus compacto (Bols et al., 1996). Independentemente do vácuo aplicado, agulhas finas resultam em maiores proporções de CCOs com cumulus comprometido (Bols et al., 1996). Com o aumento do diâmetro da agulha (20-G vs 17-G), a taxa de recuperação total de ovócitos aumentou de 46 para 57%, enquanto a recuperação de ovócitos viáveis aumentou de 37 para 39% (Fry et al., 1997).

Uma das grandes questões abordadas quando se utiliza a aspiração folicular são os efeitos colaterais, porém a sedação dos animais e a punção dos folículos não parece ter traumatizado os animais (Pieterse et al., 1988), ou qualquer sinal de estresse adicional (Viana et al., 2004), e as medidas de progesterona plasmática sugeriram que a ciclicidade não foi interrompida. Em outro estudo para verificar o efeito da punção na morfologia ovariana, Boni et al. (1997), aspiraram todos os folículos terciários (> 2 mm de diâmetro) dos ovários de vacas da raça Holandesas duas vezes por semana, com 3 ou 4 dias de intervalos durante 3 meses, e abateram os animais após as aspirações. Os autores observaram que a punção semanal (duas vezes) de todos os folículos terciários aboliu os ciclos estrais e levou à um aumento na frequência da onda folicular sem aparentes efeitos negativos no trato reprodutivo ou ovários (Boni et al., 1997).

Da mesma forma, Galli et al. (2001) constataram que a OPU não teve nenhum efeito colateral, mesmo depois de duas aspirações por semana por mais de um ano, como foi o caso de algumas doadoras. Entretanto, esses mesmos autores relatam que em alguns casos, um endurecimento leve da superfície dos ovários pode ocorrer após vários meses de coletas repetidas.

Em concordância com esses achados Snel-Oliveira et al. (2001) avaliando lesões em ovários de novilhas nelore pré-pubescentes submetidas a três sessões de OPU observaram lesões macroscópicas como fibroses e aderências de fimbrias, e lesões microscópicas como áreas irregulares na túnica albugínea, fibrose com proliferação de

tecido conjuntivo estendido ao córtex com áreas triangulares ou ovais de 200-300µm de profundidade.

Outro ponto observado por Snel-Oliveira et al. (2001) foi que folículos primordiais e primários inexisteriam embaixo das áreas de fibrose, e que nesta existiam muitos folículos atrésicos e corpos fibrosos e poucos folículos secundários e terciários, portanto a OPU causa injúria em vários graus em novilhas pré-púberes, devendo esta técnica ser procedida com cautela.

Além das lesões nos ovários outro problema observado após repetidas OPUs, foi que a partir da quinta sessão, se tornou cada vez mais difícil obter uma boa anestesia peridural, mesmo alternando o espaço intervertebral utilizado para infiltração anestésica. A diminuição da qualidade do bloqueio anestésico pode contribuir negativamente para a taxa de recuperação de ovócitos em animais aspirados duas vezes por semana (Viana et al., 2004).

A técnica de OPU também pode ser utilizada com efeito terapêutico sobre as doadoras inférteis, especialmente aquelas afetadas por cistos ovarianos. A maioria das vacas doadoras em programas de TE, tem infertilidade secundária devido ao tratamento de superovulação repetida. Galli et al. (2001), observaram que praticamente todas as doadoras vazias entram em cio dentro de duas semanas a partir da última aspiração de ovócitos e podem ser inseminadas com êxito.

Observações indicam claramente que aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia induz e sincroniza a emergência da onda folicular subsequente, e, quando é realizada duas vezes por semana, gera um maior número de folículos disponíveis e maior porcentagem de ovócitos de qualidade 1 e 2 quando comparado com o regime de uma vez por semana.

Esses resultados podem ser atribuídos à aspiração de um pool de folículos recrutados logo após a primeira aspiração e antes do estabelecimento da dominância folicular e regressão de folículos subordinados (Garcia et al., 1998; Galli et al., 2001). O programa de coleta de doadoras uma vez por semana permite que essas apresentem estro, o que nunca ocorre quando as coletas são realizadas duas vezes por semana (Galli et al., 2001). Na aspiração folicular comercial tem se utilizado intervalos de 15 dias entre as aspirações.

Os animais *Bos indicus* apresentam naturalmente maior número de folículos por onda em relação a taurinas (Blaschi et al., 2004). Vacas Nelore produzem,

em média, 25 ovócitos por sessão de aspiração folicular, esta média de ovócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias (Rubin et al., 2004). Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de ovócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de até 564 ovócitos obtidos em um único procedimento (Santos et al., 2005).

Em estudo retrospectivo de OPU comerciais realizadas de janeiro de 2001 a maio de 2006, Rubin (2006), selecionou 420 doadoras da raça Nelore, de alto valor genético, com idades variando de 2 a 8 anos (média de 5 anos), que foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia. Ao final de 1504 aspirações, obteve-se 27966 ovócitos, sendo 22809 (81,6%) viáveis e 5157 (18,4%) inviáveis. A média de ovócitos viáveis por aspiração folicular foi de 15,2. Foram produzidos 7725 embriões e 2585 prenheses (1,7 prenheses/aspiração). Do total de prenheses obtido, subtraindo-se as mortes embrionárias, a eficiência foi de 29,9% (2312/7725), ou seja, 1,5 prenheses/aspiração.

Cruz et al. (2009), encontraram taxa média de ovócitos obtidos por OPU de 4,6 ovócitos por sessão de fêmeas bovinas *Bos taurus taurus* (Devon) e 16,3 ovócitos *Bos taurus indicus* (Nelore). Rubin et al. (2005), avaliando a influência do grau de sangue zebuíno na produção de ovócitos relataram que para animais *Bos taurus* da raça Aquitânica a média por sessão de aspiração foi de 3,7 ovócitos aspirados; para animais da raça Canchim 13,6 e para os da raça Nelore 18,4 ovócitos. Esses resultados mostram que aumentando a porcentagem de sangue Nelore na constituição racial, há também um incremento na produção de ovócitos.

A alta produção de ovócitos nesta raça é um importante componente para explicar como OPU/PIV se tornou a opção preferencial para produção de embriões no Brasil (Pontes et al., 2009).

2.5.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Quando os ovócitos são aspirados dos folículos ovarianos (normalmente entre 2- 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e

necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro* (MIV) (Sirard et al., 1992; Dode et al., 2002). Ovócitos são muito sensíveis ao choque térmico, portanto durante a coleta devem ser mantidos em solução salina fosfatada tamponada (Dulbecco's PBS) ou em TCM-199 (Hepes) em temperatura constante de 38.5 a 39°C evitando oscilações (Galli et al., 2003).

As condições de maturação utilizados na maioria dos laboratórios são o meio TCM-199 com sais de EARLE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH), em 5% de CO₂ em ar a 38.5°C por um período de 20-24h de incubação (Dode, et al., 2002; Galli et al., 2003). Neste período os ovócitos completam sua maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e podem então serem fecundados. Quando as condições de coleta e cultivo são ideais, cerca de 90% dos ovócitos chegam à metáfase II (Galli et al., 2003).

Vários fatores afetam o sucesso da maturação *in vitro* de ovócitos, tanto fatores intrínsecos, quanto fatores específicos do ambiente de cultivo. Dentre os fatores externos, pode-se citar o meio de maturação propriamente dito envolvendo composição, osmolaridade, pH, presença de soro e hormônios; e fatores do ambiente como temperatura, tensão de O₂ e volume do meio (Holm & Callesen citado em Nagai, 2001).

Vários estudos na tentativa de melhorar a eficiência da MIV vêm sendo realizados, com a adição de diferentes substâncias ao meio. Meios padrões podem ser modificados de acordo com os protocolos de cada laboratório, podendo ser suplementados com fonte de energia como glicose e piruvato; fonte protéica como soro fetal bovino, BSA, macromoléculas sintéticas (ácopolivinílico -PVA) (Russell et al., 2006) e fluido folicular bovino (FFb) (Elmileik et al., 1995). Fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares durante o desenvolvimento do folículo tais como, fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) já foram testados durante maturação *in vitro* (MIV). Usando células foliculares e os hormônios angiotensina II (Ang II) e IGF-I, obteve-se um incremento significativo no índice de desenvolvimento embrionário precoce (Giometti et al., 2005)

Um dos fatores que influencia a PIV comercial é o fato de que ovócitos de diferentes doadoras necessitam ser cultivados separadamente, muitas vezes, em grupos pequenos (De Roover et al., 2008). Estudos têm mostrado que quando ovócitos são maturados, em grupo apresentam maior taxa de blastocisto no D 7 do que quando são maturados individualmente (Ward et al., 2000). De fato Brum et al. (2005), relataram que

a produção de blastocistos bovinos aumentou quando os ovócitos foram maturados em grupos de 10 e 20, comparado com o grupo de 5 ovócitos em uma proporção (1:10, 1:5 e 1:1 ovócitos/ μ l). A quantidade de meio para cada ovócito, durante a maturação, não afetou a clivagem ou a produção de blastocistos, porém a taxa de eclosão foi afetada quando o volume de 1 μ l de meio por ovócito foi utilizada.

A maioria dos estudos de maturação *in vitro* é realizada com CCOs obtidos de folículos com 2-8 mm de diâmetro, provenientes de ovários de matadouro. Devido a este fator em muitas pesquisas realizadas a origem dos ovários, coleta, seleção e manipulação do CCOs antes do início da maturação são minimamente descritas e, certamente, diferem entre laboratórios. Os dados experimentais obtidos em estudos, que buscam revelar algum efeito de determinadas substâncias sobre o desenvolvimento *in vitro*, são, por muitas vezes difíceis de interpretar, devido a esta falta de informações da origem do material biológico (Bevers et al., 1997). Neste aspecto a utilização de ovócitos provenientes de OPU de animais com histórico conhecido é muito interessante e pode ser mais informativo quando se testa substâncias na PIV.

2.5.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para que a fecundação ocorra os espermatozóides precisam atravessar a camada das células do *cumulus*, que estão dispersas em ácido hialurônico, com auxílio da enzima hialuronidase, que digere esse conteúdo intercelular. O movimento de hiperativação permite a migração dos gametas masculinos em direção ao ovócito (Palma, 2001). Os espermatozóides necessitam estar capacitados para se ligarem aos receptores ZP3 na zona pelúcida (ZP) do ovócito (Silva, 1998) e, então sofrerem a reação do acrossoma e ultrapassarem a zona. Após passarem pela ZP esses chegam ao espaço perivitelínico, se ligam à membrana plasmática do ovócito e são incorporados ao ooplasma.

Após a penetração do espermatozóide no citoplasma, o ovócito é ativado respondendo, inicialmente, com a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais e síntese protéica (Gonçalves et al., 2001). Com a finalidade de evitar a penetração de mais de um

espermatozóide, ocorre o bloqueio primário ou vitelínico devido à rápida despolarização da membrana. O bloqueio secundário ocorre logo após, onde conteúdo dos grânulos corticais, enzimas hidrolíticas, proteinases e peroxidases, são liberadas em toda a superfície do ovócito provocando a hidrólise parcial das proteínas da ZP (Gonçalves et al., 2001).

A ativação faz com que o ovócito retome sua atividade metabólica e conclua a segunda divisão meiótica (MII), com a expulsão do 2º corpúsculo polar. Segue-se, então, a descondensação da cromatina haplóide do gameta masculino, ocorrendo formação e aposição dos pronúcleos masculino e feminino (Palma, 2001) e singamia.

Portanto, para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os ovócitos tenham sofrido a maturação completa, e que os espermatozóides tenham sido apropriadamente preparados (Dode & Rumpf, 2002), e que os mesmos se encontrem em um ambiente adequado.

Dois meios são em geral utilizados para FIV, o meio base TALP e o meio base SOF sem glucose. Esses são suplementados com concentrações variadas de heparina e outros fatores importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina (PHE). Espermatozóides e ovócitos são co-incubados por um período de 18- 20h (Galli et al., 2003) em temperatura de 39 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2001).

Com a descoberta da capacitação espermática por Austin e Chang em 1951, foi possível realizar com sucesso a primeira fecundação *in vitro* em mamíferos realizada por Chang em 1959 (citado em Kane 2003). Desde então, a preparação de espermatozóides para a FIV tornou-se um procedimento importante para obtenção de melhores resultados, considerando que espermatozóides móveis, íntegros e capacitados são necessários para que a fecundação ocorra (Parrish et al., 1999). Essa preparação é importante não só para remover o plasma seminal ou o crioprotetor, mas também para selecionar os melhores espermatozóides disponíveis na amostra a ser utilizada (Dode et al., 2002; Henkel & Schill, 2003), além de remover agentes infecciosos e debris celulares (Henkel & Schill, 2003).

Para a preparação do sêmen a ser utilizado na FIV, vários métodos têm sido descritos. Entre eles, pode-se citar a lavagem por centrifugação, gradientes de densidade, filtração em coluna de fibra de vidro e migração ascendente. Os mais

utilizados são gradiente de densidade utilizando Percoll e a migração ascendente, conhecida por swim-up (Dode et al., 2002).

Resultados obtidos por Dode et al. (2002) mostraram que o gradiente de Percoll, lavagem e swim-up podem ser usados para preparar as amostras de sêmen para fecundação *in vitro*. Porém devido a maior porcentagem de espermatozóides móveis recuperados e o menor tempo necessário para sua realização o método de Percoll é o mais utilizado para a preparação de espermatozóides bovino a serem utilizados na FIV (Parrish et al., 1995). Independentemente do método utilizado, os melhores resultados foram obtidos quando espermatozóides e ovócitos foram co-incubadas por 12 h. No entanto, a prorrogação desse período para até 18 h, não teve efeito negativo na taxa de fecundação e clivagem (Dode et al., 2002).

Outro fator importante que afeta o sucesso da PIV é o touro, sendo esta uma grande fonte de variação. Palma & Sinomatz (2004) realizaram um estudo no qual utilizaram, na PIV, sêmen de 63 touros que na IA haviam apresentado taxa de prenhes aos 60 a 90 dias de 65 a 75% e observaram taxas de blastocisto variando de 6,9 a 51,2% sendo observadas variações significativas.

2.5.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fecundação, os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecem até atingirem o estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário é marcado pela primeira clivagem, a ativação do genoma embrionário no estágio entre 8 e 16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 após a FIV. Nesse estágio os embriões podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (Dode & Rumpf, 2002).

Um sistema de cultivo adequado, que proporcione um maior desenvolvimento com melhor qualidade de embriões *in vitro* se tornou uma preocupação para a aplicação comercial dessa tecnologia. Vários protocolos foram desenvolvidos, incluindo co-cultivo com células somáticas, cultivo livre de células ou mesmo cultivo *in vivo* em ovidutos de ovelhas (Galli et al., 2003).

O meio mais utilizado atualmente é o meio *synthetic oviductal fluid* (SOF), entretanto vários tem sido utilizados tais como meio de cultivo celular 199 (TCM-199), meio Ham's F-10, CR1 e CR2, suplementados com proteínas, substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte protéica tal como soro fetal bovino (SFB), soro sintético quimicamente definido (SSS), albumina sérica bovina (BSA), ou as macromoléculas como álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP).

Assim como para a MIV, vários fatores afetam o sucesso do cultivo *in vitro* principalmente fatores específicos do ambiente de cultivo. Considerando que a quantidade de estruturas com capacidade de desenvolver até o estágio de blastocisto depende do ovócito e da MIV, a qualidade dos embriões produzidos é determinado pelas condições de cultivo. Dentre os fatores ambientais, pode-se citar o meio de cultivo propriamente dito envolvendo composição, osmolaridade, pH, presença de soro e outros como temperatura, tensão de O₂ e volume do meio.

O estresse oxidativo durante o cultivo tem sido enfatizado como um dos fatores responsáveis pela menor produção e má qualidade de embriões produzidos *in vitro* (Corrêa et al., 2008). O sistema de cultivo com menor tensão O₂ (5%) parece ter um efeito benéfico no desenvolvimento do embrião. Entretanto, quando o sistema de baixa tensão de O₂ foi comparado com o sistema de alta tensão com co-cultivo celular, foi observado que a taxa de blastocisto e o número total de células foram semelhantes para ambos os sistemas (Corrêa et al., 2008). Os autores sugeriram que a presença das células somáticas atuaria protegendo os embriões contra o estresse oxidativo causado pela alta tensão de O₂.

Outra questão abordada é a presença de soro indefinido em meios de cultivo, pois este apresenta uma variação de lote a lote, aumenta o risco de contaminação viral ou por príons, e leva a problemas durante o desenvolvimento fetal (Sagirkaya et al., 2007).

Estudos comparando a produção de embriões em presença de soro e BSA tem mostrado que apesar da qualidade dos embriões serem superiores na presença de BSA, as taxas de blastocisto são menores incluindo as taxas de eclosão (Wang et al. 1997; Nedambale et al., 2004). Grupos têm demonstrado que a suplementação com soro tanto durante a maturação como no cultivo foi capaz de modificar a cinética do desenvolvimento embrionário, e a ausência do soro durante a MIV-FIV aumentou a

duração do primeiro e quarto ciclo celulares (Oliveira et al., 2006; Lonergan et al., 2006). Apesar de possuírem origem e composição semelhantes, estudos sugerem que há divergência no cultivo quando meio contendo soro e BSA são comparados. Leme (2008) observou que o sistema de cultivo suplementado com SFB produziu maior quantidade de embriões, mais precocemente e estes não apresentaram diferença na qualidade das estruturas produzidas quanto à criotolerância e expressão de alguns genes, quando comparados com os produzidos em meio suplementado com BSA ou BSA inicialmente e termino com SFB.

Quando o soro sintético quimicamente definido (SSS) foi utilizado para substituir o soro fetal bovino (SFB) durante o cultivo embrionário, foi observado que em meios de cultura suplementado com 10% SFB (controle), 10% SSS ou 10% SSS + 10 ng/ml do fator de crescimento epidérmico (EGF), as taxas de clivagem e de desenvolvimento ao estágio de blastocisto não diferiram. Porém o número de células foi maior nos blastocistos cultivados em meio contendo SSS e EGF. Esses autores observaram também que nos embriões cultivados em meio suplementado com SSS o número de núcleos apoptóticos era maior quando comparado aos embriões cultivados em SFB (Sagirkaya et al., 2007).

Com relação ao cultivo individual ou em grupo, vários trabalhos têm mostrado que os embriões cultivados em gotas individualmente apresentaram qualidade inferior (menor número total de células), resultando em blastocistos com tolerância reduzida à criopreservação. Em contraste, o sistema “Well of the Well” modificado (mWOW) melhora a qualidade do embrião. Esse sistema mWOW propicia, um microambiente favorável onde os fatores provenientes do embriões permanecem no meio em uma maior concentração, permitindo ao mesmo tempo o cultivo individual do embrião (Pereira et al., 2005).

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal (OPU) em novilhas Nelore. Foram utilizadas 27 novilhas cíclicas da raça Nelore, sendo que todos os animais passaram pelos três tratamentos em delineamento “cross-over”. Os animais foram sincronizados e no D6 após a manifestação do cio foi realizada a ablação dos folículos ≥ 5 mm de diâmetro, com colocação de implante intravaginal de progesterona e aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$. Nos animais do grupo controle (Tc) a OPU foi realizada no D12 após estro; no grupo SOV-LH (T₁) no D8 após estro teve início a administração de FSH (162 UI-PLUSET[®]) em 6 doses decrescentes de 12 em 12 horas, e a OPU foi realizada 36 horas após a última aplicação de FSH, sendo que 6 horas antes da OPU os animais receberam uma aplicação de 25mg de LH; no grupo SOV (T₂) os animais receberam o mesmo tratamento do T₁, porém sem aplicação de LH. No momento da OPU os folículos foram contados, classificados pelo tamanho em > 6 mm e < 6 mm e aspirados separadamente de acordo com o tamanho. Os CCOs recuperados foram classificados de acordo com a qualidade morfológica (1-4) e os de qualidade grau 1,2,3 foram utilizados para a PIV. Um total de 833 ovócitos foram maturados e fecundados *in vitro*, sendo que a taxa de clivagem foi avaliada no D2 (48h após a inseminação) a taxa de blastocisto avaliada nos dias 6,7,8 e a taxa de eclosão no dia 8. Para detectar a existência de efeito do tamanho dos folículos (>6 mm e <6 mm) e tratamentos hormonais (Tc, T₁, T₂), bem como suas interações sob a taxa de ovócitos recuperados e produção de embriões foi utilizado o modelo linear generalizado misto (MLGM). Para o número de folículos aspirados, ajustou-se um modelo linear generalizado misto família quase Poisson, com função de ligação log, para analisar a taxa de eclosão foi utilizado o modelo linear generalizado família binomial. Os resultados indicaram que o tratamento T₂ ($8,5 \pm 5,5$) apresentou número médio de ovócitos recuperados maior ($P < 0,05$) do que o T₁ ($7,2 \pm 4,3$) e o Tc ($6,7 \pm 4,3$). Quando as médias foram avaliadas por tamanho de folículo, foi observado número médio de ovócitos recuperados a por sessão maior ($P < 0,05$) nos folículos <6 mm ($9,3 \pm 5,4$) em comparação aos >6 mm ($5,7 \pm 3,2$). O número de folículos <6 mm foi maior ($P < 0,05$) no Tc ($34,8 \pm 16,3$) em relação ao T₁ ($8,5 \pm 8,6$) e T₂ ($10,1 \pm 7,6$), e estes foram semelhantes ($P > 0,05$). Já para folículos >6 mm um maior número foi observado no T₁ ($23,5 \pm 11,5$) e T₂ ($19,1 \pm 6,8$) em comparação ao Tc ($1,8 \pm 1,4$) ($P < 0,05$). A produção de ovócitos de qualidade I, II e III de folículos < 6 mm, foi maior no Tc em comparação aos tratamentos T₁ e T₂ ($P < 0,05$). Para folículos < 6 mm o

T2 produziu mais ovócitos de qualidade I em média, 2,62 vezes maior ($P < 0,05$) em relação ao T1. O contrário ocorreu na produção de ovócitos de qualidade I, II e III de folículos $>6\text{mm}$ onde T1 e T2 foram semelhantes, porém produziram mais ovócitos que Tc ($P < 0,05$). Os resultados mostraram que a taxa de blastocisto não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$) quando apenas os folículos menores do que 6 foram avaliados, sendo $31,2 \pm 12,2\%$, $31,0 \pm 16,9\%$ e $24,3 \pm 14,1\%$ para Tc, T1 e T2, respectivamente. Entretanto, quando o tamanho do folículo $>6\text{mm}$ foi considerado, um aumento ($P < 0,05$) na taxa de blastocistos foi observada nos tratamentos T1 ($47,8 \pm 21,2\%$) e T2 ($39,1 \pm 19,8\%$) em relação ao Tc ($22,2 \pm 44,1\%$). O efeito do tratamento hormonal na produção embrionária também foi detectado quando a análise global foi realizada independente do tamanho do folículo, sendo a taxa de blastocisto maior ($P < 0,05$) no T1 ($39,4 \pm 20,5\%$) e T2 ($31,7 \pm 18,4\%$) em relação ao Tc ($26,7 \pm 31,7\%$). A taxa de eclosão foi semelhante entre todos os tratamentos considerando ou não o tamanho folicular ($P > 0,05$). A superestimulação ovariana, com ou sem aplicação de LH, aumentou a produção de embriões *in vitro* em novilhas Nelore. Portanto a aplicação de FSH na onda sincronizada para aspiração folicular pode ser uma alternativa viável para a produção comercial de embriões *in vitro*.

Palavras chaves: estimulação hormonal, *Bos indicus*, fecundação *in vitro*, produção *in vitro* de embriões.

2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of ovarian stimulation in quantity and quality of oocytes obtained by ovum pick up (OPU) in Nellore heifers. Twenty seven Nellore cyclical heifers were used in a cross-over experimental design, where all the animals passed by each of the three treatments. All animals were sincronized and on D6 after estrus detection the ablation of follicles ≥ 5 mm in diameter was performed and the animals received an intravaginal implant of progesterone and an application of prostaglandin $F_{2\alpha}$. In the animals of the control group (Tc) the OPU was performed on D12 after estrus; in the group SOV-LH (T1) on D8 after estrus, it has started the administration of FSH (162 UI-PLUSET®) in 6 decreasing doses of 12 to 12 hours, the OPU was performed 36 hours after the last application of FSH and, 6 hours before OPU the animals received one application of 25 mg of LH; in the group SOV (T2) the animals received the same treatment as T1, but without the application of LH. At the time of OPU follicles were counted and classified by the size in > 6 mm and <6 mm, and then were aspirated separately. The recovered COCs were classified according to morphological quality (I-IV) to quality in grade I, II, III and were used for IVP. A total of 833 oocytes were matured in vitro, cleavage rate was evaluated on D2 [48 h post insemination (pi)] and blastocyst rate on day 6, 7 and 8 pi, being the hatching rate evaluated on D8 pi. To detect effect of the follicles size (> 6 mm and <6 mm) and hormonal treatments (Tc, T1, T2) and their interactions in the rate of retrieved oocytes and embryo production the generalized linear mixed model (MLGM) with normal distribution and *log* link function was used. For the number of aspirated follicles, a generalized linear mixed model almost Poisson family was adjusted with log link function. To analyze the hatching a generalized linear model binomial family was used. The results indicated that in T2 treatment (8.5 ± 5.5) a higher number of oocyte was recoverd ($P<0.05$) than in T1 (7.2 ± 4.3) and Tc (6.7 ± 4.3). When the means were evaluated by follicles size, it was observed a higher number of oocytes per session ($P<0.05$) in follicles <6 mm (9.3 ± 5.4) compared to >6 mm (5.7 ± 3.2). The number of follicles <6 mm was higher ($P <0.05$) in Tc (34.8 ± 16.3) compared to T1 (8.5 ± 8.6) and T2 (10.1 ± 7.6), which were similar between them ($P>0.05$). For follicles > 6 mm a larger number was observed in T1 (23.5 ± 11.5) and T2 (19.1 ± 6.8) compared to Tc (1.8 ± 1.4) ($P<0.05$). On follicles <6 mm, higher number of oocytes

grade I, II and III were recovered in Tc compared to treatments T1 and T2 ($P < 0.05$). For follicles < 6 mm the T2 produced more oocytes quality I, being 2.62 times higher ($P < 0.05$) than T1. In contrast, for follicles > 6 mm number of oocytes grade I, II and III was similar between T1 and T2, but it was lower in Tc ($P < 0.05$). The results showed that the blastocyst production did not differ between treatments ($P > 0.05$) when only the follicles smaller than 6 mm were considered, being $31.2 \pm 12.2\%$, $31.0 \pm 16.9\%$ and $24.3 \pm 14.1\%$ for Tc, T1 and T3, respectively. However, when only follicle > 6 mm were considered, an increase ($P < 0.05$) in blastocyst rate was observed in T1 treatments ($47.8 \pm 21.2\%$) and in T2 ($39.1 \pm 19.8\%$) compared to Tc ($22.2 \pm 44.1\%$). The effect of hormonal treatment on blastocyst production was also detected when a global analysis was conducted independent of follicle size, being the blastocyst rate higher ($P < 0.05$) in T1 ($39.4 \pm 20.5\%$) and T2 ($31.7 \pm 18.4\%$) than in Tc ($26.7 \pm 31.7\%$). The hatched rate was similar among all treatments considering or not the follicular size ($P > 0.05$), in the general analysis the hatched rate was similar for Tc ($39.0 \pm 12.2\%$), T1 ($38.7 \pm 25.3\%$) and T2 ($35.5 \pm 24.1\%$). The ovarian stimulation, with or without application of LH, increased the in vitro production of embryos in Nellore heifers. Therefore the application of FSH in the synchronized wave for follicular aspiration may be a viable alternative to the commercial production of embryos in vitro.

Key words: hormonal stimulation, *Bos indicus*, in vitro fertilization, in vitro embryo production.

3 INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias reprodutivas na produção animal, tais como a transferência de embriões (TE) e a aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (PIV), possibilita aumentar o número de nascimentos por doadora de alto mérito genético (Yang et al., 1998).

Apesar de inúmeros estudos realizados nos últimos 30 anos com o objetivo de melhorar a eficiência da PIV, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto dificilmente é superior a 40% (Lonergan & Fair, 2008). O sucesso da PIV depende de um conjunto básico de tecnologias de reprodução que são interdependentes e que envolve a obtenção de ovócitos imaturos dos folículos ovarianos, maturação *in vitro* de ovócitos, fecundação *in vitro*, e cultivo *in vitro* de embriões (Kane, 2003). Dentre todos os fatores que influenciam a PIV, o folículo de origem parece ser um fator determinante na obtenção de ovócitos com maior capacidade de produzir blastocistos saudáveis, o que está normalmente associado com maiores taxas de prenhes (Sirard, et al., 2006). Isso permite supor que a competência pode ser adquirida em condições foliculares específicas.

Portanto, modificações do ambiente folicular pela utilização de diferentes protocolos hormonais podem aumentar a competência de ovócitos obtidos por aspiração transvaginal. De fato, estudos indicam que a indução da diferenciação folicular pela manipulação do protocolo de estimulação ovariana, como por exemplo, uma privação de FSH ou “Coasting”, após o tratamento superestimulatório resultou na recuperação de ovócitos mais competentes, sendo, a maioria, capaz de se desenvolver até o estágio de

blastocisto (Blondin et al., 2002). Esse período de privação induziria um início de atresia que enviaria um sinal para que o ovócito adquirisse a competência (Sirard et al., 2006). A utilização desses protocolos representa uma ferramenta importante para a utilização comercial da PIV, visto que a melhora da qualidade dos ovócitos é fundamental para aumentar o número de ovócitos utilizáveis por sessão de aspiração, e conseqüentemente, o número de crias por fêmea.

Entretanto, esse efeito benéfico da estimulação hormonal seguido por um período de privação de FSH na qualidade dos ovócitos não foi observado quando fêmeas zebuínas foram utilizadas (Monteiro et al., 2009). É possível que as diferenças existentes, em vários aspectos reprodutivos, entre *Bos indicus* e *Bos taurus* sejam responsáveis pela falta de resposta quando tratamento hormonal semelhante foi usado para esses dois tipos de animais. Portanto, mais estudos são necessários para determinar se o período de privação de FSH afeta os resultados da PIV em fêmeas zebuínas, e qual o melhor protocolo a ser utilizado nesses animais.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da estimulação ovariana seguido por um período de restrição de FSH em novilhas Nelore antes da aspiração folicular transvaginal, sobre o número e qualidade dos ovócitos recuperados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Ao menos que indicado, os produtos químicos foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA). Todos os meios utilizados para PIV de embriões, meio de maturação, meio de fecundação, meio de lavar espermatozóide (SP-TALP), gradiente de *Percoll* 90% e o meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) foram produzidos no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4.2 Local

O experimento foi realizado no Campo Experimental Sucupira, Estação Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado a Sudoeste da cidade de Brasília – DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02'W), com altitudes que variam de 1050 a 1250m. O clima predominante é o tropical chuvoso, indicando invernos secos e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 1763,118ha, distribuída em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (Walter e Sampaio, 1998).

4.2 Animais

Foram utilizadas 27 novilhas cíclicas da raça Nelore, com peso médio de 510 Kg, (peso medido semanalmente) e média de escore de condição corporal 3,75 (escore 1-5), com aproximadamente 3,5 anos de idade, os animais foram mantidos em confinamento recebendo silagem de sorgo, com sal proteinado e água *ad libidum*. Estes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=9) Tc= Controle, T₁ e T₂. Todos os animais passaram pelos três tratamentos em delineamento “cross-over”, sendo respeitado um intervalo de 30 dias entre o início de cada repetição.

4.3 Produção de Embriões *In Vitro*

4.3.1 Recuperação de ovócitos, seleção e maturação *in vitro*

Os animais submetidos ao procedimento de aspiração folicular foram presos em tronco de contenção bovino, e após a anti-sepsia local foi realizada anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (3 a 5 ml) (Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). A guia foi posicionada no fórnix vaginal, sendo direcionado para o mesmo lado do ovário a ser aspirado (direito/esquerda). Os ovócitos foram aspirados em PBS (Phosphate buffered saline) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (Sigma[®]) e 1µl/ml de heparina sódica (Liquemine[®] i.v. Roche, Suíça), à temperatura de 39°C. A pressão de aspiração utilizada foi de 13 a 15 ml/min., os ovócitos recuperados em tubo cônico de 50 ml foram levados imediatamente ao laboratório onde passaram por filtração em malha de 80µm sendo, posteriormente, submetidos ao processo de seleção em esteromicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Alemanha[®]) e posterior maturação *in vitro*.

O equipamento utilizado consistiu de um aparelho de ultrassom (Aloka SSD 500[®] Japão), acoplado a uma probe com transdutor setorial micro-convexo de 7,5 MHz modelo UST 9125- 7.5 (Aloka[®], Japão) e um guia transvaginal WTA[®] (Brasil), uma bomba de vácuo Cook[®] VMAR5100 (Austrália), acoplada a um sistema com uma agulha 18G [(0,9 x 70) WTA[®] (Brasil)].

Para controle do sistema de produção *in vitro* do laboratório foram utilizados ovócitos de vacas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) recuperados de ovários coletados em abatedouro local e transportados em solução salina aquecida (NaCl 0,9%) suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) à 35° C. Complexos *cummulus* ovócito (CCOs) foram aspirados de folículos de 2-8 mm com escalpes 18G. O líquido folicular aspirado com os CCOs foi depositado em tubo cônico de 15 ml. Após passaram por filtração em malha de 80µm, os CCOs foram recuperados e selecionados com auxílio de estereomicroscópio.

A classificação ovocitária utilizada foi a descrita por Caixeta & Dode (2008) em que os CCOs foram considerados de qualidade 1-4, conforme resumido abaixo:

Qualidade 1. Ovócitos com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.

Qualidade 2. Ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cúmulos compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas.

Qualidade 3. Ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, zona pelúcida coberta com pelo menos 3 camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas

Qualidade 4. Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Para este experimento foram utilizados os ovócitos de qualidade 1, 2 e 3. Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para gotas de 50µl (quando colocados até 10 ovócitos), gotas de 100µl (quando colocados 11 a 20 ovócitos), gotas de 150 µl (quando colocados 21 a 29 ovócitos) ou gotas de 200 µl (quando colocados 30-35 ovócitos) de meio de maturação sob óleo de silicone. Os CCOs dos grupos Tc e T₂ foram maturados por 24 h à 39°C em 5% de CO₂ em ar. Já no grupo T₁, os CCOs foram incubados por 18 h à 39°C em 5% de CO₂ em ar. O meio de maturação consistiu de TCM 199 com sais de Earl's (Invitrogen®, CA, USA) suplementado com 12 UI/ml hormônio luteinizante (LH Sigma ®), 0,01 UI/ml de hormônio folículo estimulante (FSH – Sigma®), 0,1g/ml de L-glutamina (Sigma ®), 10% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen®, CA, USA) e antibiótico (Amicacina 0,075 mg/ml).

4.3.2 Fecundação *in vitro* e cultivo de embriões

4.3.2.1 Seleção espermática

Sêmen de um touro Nelore previamente testado e aprovado para PIV, foi descongelado e as células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* (45-90%). As amostras de sêmen foram colocadas sobre um volume total de total de 800 μL , sendo 400 μL de gradiente de *Percoll* 45% e 400 μL de gradiente de *Percoll* 90%, colocados em microtubo de 2 mL a 5.000 g por 5 min (Machado et al., 2009). O gradiente de *Percoll* 45% foi preparado com 200 μL de *Percoll* 90% e 200 μL de SP-TALP (Parrish et al., 1995). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi centrifugado por 5 min em SP-TALP a 5.400 g. Posteriormente, o *pellet* resultante foi ressuscitado com 80 μL de SP-TALP, avaliado para motilidade e concentração e utilizado para a FIV.

4.3.2.2 Fecundação *in vitro*

Os ovócitos maturados foram transferidos para gotas (com volume ajustado ao número de estruturas) de meio de fecundação. Após a centrifugação no *Percoll*, foi realizada a contagem dos espermatozoides no hematocítmetro, sendo que a concentração final na gota de fecundação foi de 1×10^6 espermatozoides vivos/mL. Espermatozoides e ovócitos foram co-incubados por 18 à 20h a 39°C com 5% de CO_2 em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o D0. O meio de fecundação utilizado foi o meio TALP (Parrish et al., 1995) suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma®), 1 mM de hipotaurina (Sigma®), 250 mM de epinefrina (Sigma®) e 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina (Sigma®).

4.3.3 Cultivo *in vitro*

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de meio SOFaaci (Holm et al., 1999) suplementado 0,34 mM de sodium tri citrato (Sigma®); 2,77 mM de myo-inositol (Sigma®) e 5% de SFB e cultivados a 39 °C e 5% CO₂ em ar. Os embriões foram avaliados no D2 pós-inseminação (pi) quanto à clivagem e no D6 e D7 e D8 pi quanto a taxa de blastocisto.

4.3.4 Avaliação do estágio de maturação ovocitária

Para avaliação do estágio de maturação ovocitária foi utilizada a coloração com lacmóide. Para isto, em cada réplica, no momento da transferência dos ovócitos selecionado para o meio de maturação MIV, uma amostra de cada tratamento (Tc = 73, T1= 60, T2=63) foi retirada. Os ovócitos foram transferidos para uma gota de 200 µL de PBS, desnudados e fixados em solução de metanol e ácido acético glacial (3:1) por pelo menos 24 horas. Após a fixação, os ovócitos imaturos foram lavados e corados com solução de lacmóide 1% em ácido acético glacial 45%. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (Nikon Eclipse E200), sendo os ovócitos classificados de acordo com o estágio de maturação em vesícula germinativa, metáfase I, anáfase I, telófase I e metáfase II.

4.4 Delineamento Experimental

4.4.1 Tratamentos

Os animais de todos os grupos receberam uma aplicação de 15 ml (s.c.) de Roborante Calier® (Hertape Calier, Espanha) e foram submetidos a um protocolo de sincronização de estro prévio ao início dos tratamentos e o dia do cio foi considerado como D0. Os tratamentos utilizados (Figura 2.1 e 2.2) estão descritos abaixo:

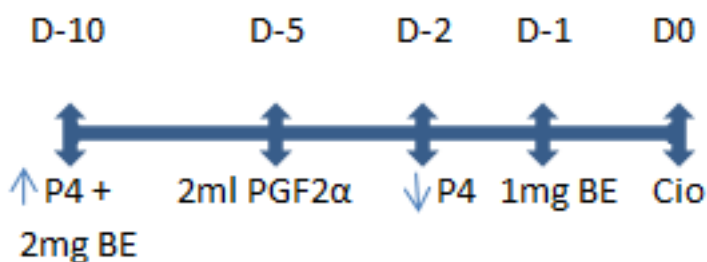


Figura 2.1 – Esquema do protocolo hormonal utilizado nos grupos experimentais, tratamento controle (Tc), tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) para sincronização de cio, representando os dias (D) de aplicação e os hormônios utilizados.

O protocolo de sincronização de estro consistiu de no dia -10 (D-10) colocação de implante intravaginal de Progesterona [(Primer[®] Grascon, Brasil) (segundo uso)] associado a aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol (i.m.) (RIC-BE[®], Brasil). No dia -5 aplicação de 2ml (i.m.) de Prostaglandina F_{2α} [(0,150 mg de d-Cloprostenol)(Prolise[®] ARSA S.R.L Argentina)]. No dia -2 foi procedida a retirada do implante intravaginal de P₄, e no dia -1 administrado 1mg de Benzoato de Estradiol (i.m.) (RIC-BE[®], Brasil). No dia 0 foi realizada a observação de estro, sendo que no dia em que o mesmo foi detectado se deu o início aos tratamentos.

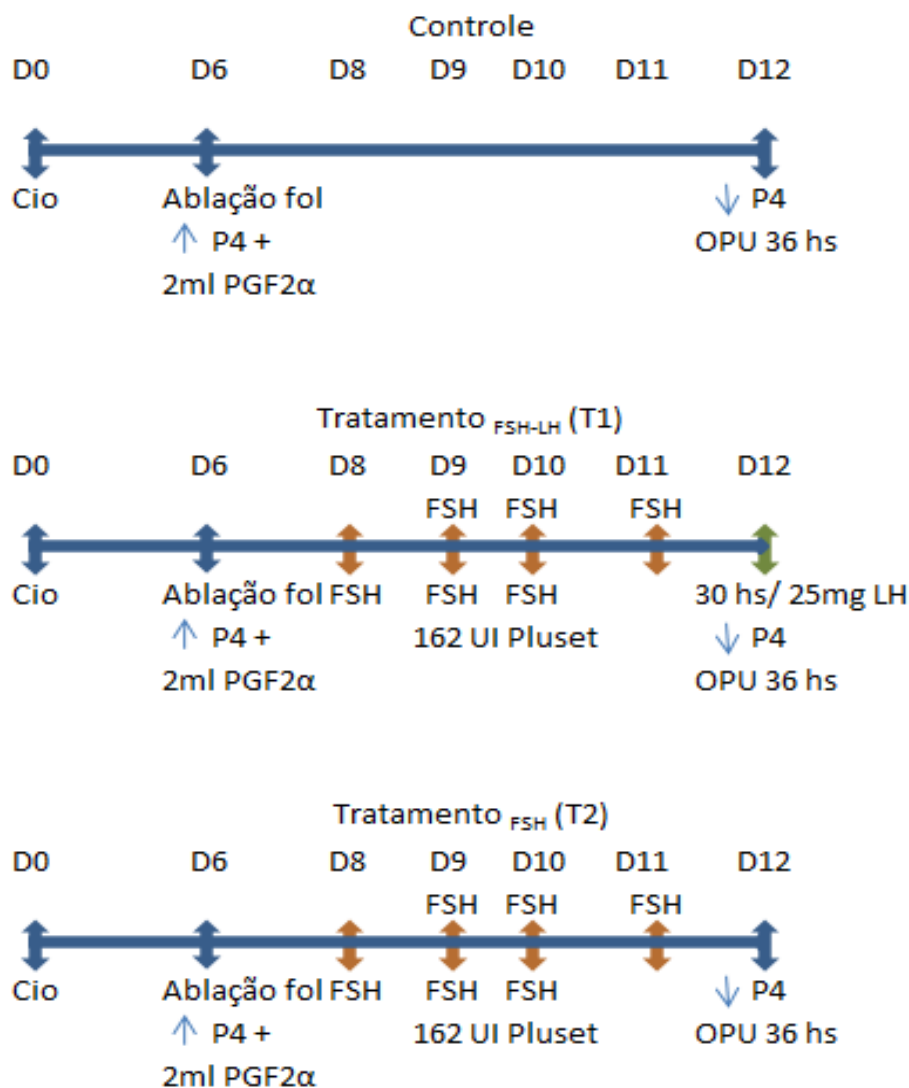


Figura 2.2 – Esquema do protocolo hormonal utilizado nos diferentes grupos experimentais, tratamento controle (Tc), tratamento 1 (T_{FSH-LH}) e tratamento 2 (T_{FSH}) representando os dias (D) de aplicação e os hormônios utilizados.

OPU- *Ovum pick-up* (Aspiração folicular transvaginal).

Tc = Controle: No D6 após a sincronização e observação de estro os animais foram submetidos a uma sessão de aspiração em que todos os folículos acima de ≥ 5 mm foram puncionados (ablação folicular). Logo após a aspiração foi colocado um implante intravaginal de Progesterona (Primer[®] Grascon, Brasil) e aplicado 2ml (i.m.) de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (0,150 mg de d-Cloprostenol)(Prolise[®] ARSA S.R.L Argentina). No D12 após estro procedeu-se a AFT com a aspiração dos folículos > 6 mm e < 6 mm separadamente.

T₁ = Idem ao Tc, porém no D8 teve início a administração de FSH (162 UI - PLUSET[®], Hertape Calier, Espanha) em 6 doses decrescentes de 12 em 12 horas (40%,

30%, 20% , totalizando 90% da dose de superestimulação convencional). A aspiração dos folículos > 6 mm e < de 6 mm separadamente foi realizada 36 horas após a última aplicação de FSH. Seis horas antes da aspiração folicular (às 30hs) procedeu-se a administração de 25mg de LH (Lutropin[®], Bioniche Animal Health, Canadá)

T₂ = Idem a T₁, porém sem aplicação do LH às 30hs após a última aplicação de FSH.

Em todos os grupos para acompanhamento de dinâmica folicular foram realizadas avaliações com ultrasonografia transretal (Aloka SSD 500[®] Japão), utilizando uma probe com transdutor linear retal de 7,5 MHz modelo UST 5541- 7.5 (Aloka [®], Japão), em D0, D6, D8 e D12.

4.5 Análise Estatística

Para detectar a existência de efeito do tamanho dos folículos (>6 mm e <6 mm) e tratamentos hormonais (Tc, T₁, T₂), bem como suas interações sob a taxa de ovócitos recuperados, e produção de embriões utilizou-se os modelos lineares generalizados mistos (MLGM) (McCullagh & Nelder 1989), com distribuição normal e função de ligação log. Para o número de folículos aspirados, ajustou-se um modelo linear generalizado misto, família “quase-Poisson” com função de ligação log. Para analisar a qualidade dos ovócitos recuperados, o MLGM com distribuição Poisson inflacionada de zeros com função de ligação log. Para analisar a taxa de eclosão foi utilizado o modelo linear generalizado família binomial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

As médias do número de ovócitos recuperados em cada tratamento e em cada grupo de tamanho de folículo são apresentadas na Tabela 2.1.

O tratamento FSH (T2) apresentou maior número de ovócitos recuperados que os demais. Quando a média foi calculada levando em consideração apenas o tamanho de folículo foi observado que os folículos <6 mm proporcionaram uma maior quantidade de ovócitos comparados aos >6mm.

Tabela 2.1 – Média do número de ovócitos recuperados por tratamento hormonal (Tc, T1, T2), e média de ovócitos recuperados de folículos maiores e menores que 6mm de diâmetro

	Média ± Desvio Padrão
Tratamentos Hormonais	
Tc	6,7 ± 4,3 ^a
T1	7,2 ± 4,3 ^a
T2	8,5 ± 5,5 ^b
Tamanho do Folículo	
<6	9,3 ± 5,4 ^a
>6	5,7 ± 3,2 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

A taxa de recuperação em folículos >6mm foi 61% (1197 folículos aspirados/734 ovócitos recuperados) e a de folículos <6mm 94,34% (1375 folículos aspirados/1297 ovócitos recuperados).

A distribuição média dos folículos aspirados dos diferentes tamanhos em cada tratamento está apresentada na Tabela 2.2. O grupo Tc apresentou uma maior quantidade (P<0,05) de folículos <6mm no momento da aspiração do que os grupos T1 e T2. Em contraste, a quantidade de folículos >6mm foi maior (P<0,05) nos tratamentos em que os animais foram superestimulados (T1 e T2), independente de terem recebido ou não administração de LH ao final do tratamento.

Tabela 2.2 – Distribuição média do número de folículos aspirados de acordo com os tratamentos Tc, T1, T2, e tamanho dos folículos

Tratamento	Tamanho do folículo (mm)	
	Média ± DP	
	<6	>6
Tc	34,8 ± 16,3 ^a	1,8 ± 1,4 ^a
T1	8,5 ± 8,6 ^b	23,5 ± 11,5 ^b
T2	10,1 ± 7,6 ^b	19,1 ± 6,8 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística (P<0,05).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

A produção de ovócitos de qualidade I e II de folículos < 6mm foi maior no Tc em comparação aos tratamentos T1 e T2 (P<0,05) (Tabela 2.3). Porém para

folículos < 6mm o T2 produziu mais ovócitos de qualidade I, em média 2,62 vezes mais ($P<0,05$), do que o T1. Em contraste, a recuperação de ovócitos de qualidade I e II de folículos >6mm nos tratamentos T1 e T2 foi semelhante e maior do que no Tc ($P<0,05$).

Tabela 2.3 – Distribuição média do número de ovócitos dos vários graus de qualidade de acordo com tratamento (Tc, T1, T2) e tamanho de folículo

Tamanho Folículo (mm)	Tratamento	Qualidade dos Ovócitos			
		I	II	III	IV
<6	Tc	2,1±3,3 ^a	6,4±6,6 ^a	6,3±4,3 ^a	16,0±10,7 ^a
	T1	0,2±0,7 ^c	1,4±1,8 ^b	2,8±3,5 ^b	3,4±3,3 ^c
	T2	0,7±1,2 ^b	1,9±2,5 ^b	2,6±2,4 ^b	4,8±4,7 ^b
>6	Tc	0,1±0,3 ^b	0,1±0,4 ^b	0,04±0,2 ^b	0,6±0,9 ^b
	T1	1,3±1,7 ^a	2,8±3,0 ^a	3,5±2,0 ^a	5,2±6,5 ^a
	T2	0,8±1,3 ^a	2,8±1,3 ^a	3,9±2,4 ^a	5,2±3,6 ^a

^{a,b} Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P<0,05$).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

Amostras de ovócitos de todos os tratamentos foram retiradas logo após a aspiração folicular para determinação do estágio da meiose. Dos 196 ovócitos avaliados todos se encontravam em estágio de vesícula germinativa (Figura 2.3).

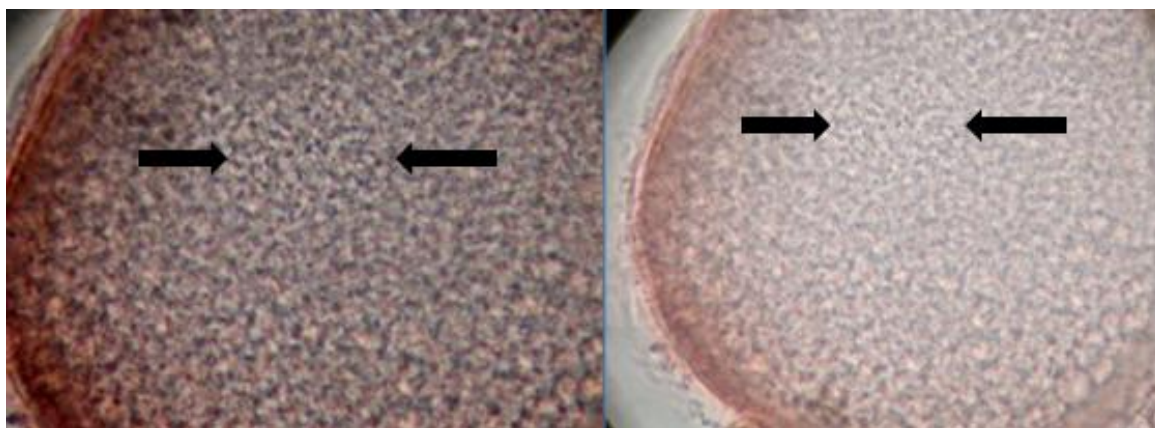


Figura 2.3 - Imagem microscópica dos ovócitos corados com lacmóide (1%), mostrando a presença da Vesícula Germinativa (setas pretas), aumento de 1.000 x (Nikon Eclipse E200).

A média de clivagem e produção embrionária (Tabela 2.4) de ovócitos aspirados de folículos <6mm foi semelhante ($P>0,05$), entre os três tratamentos. No entanto, a taxa de clivagem e produção embrionária de ovócitos aspirados de folículos >6mm foi maior ($P<0,05$) nos tratamentos T1 e T2 quando comparados ao Tc (Tabela 2.5).

Tabela 2.4–Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8, nos tratamentos Tc, T1, T2 para ovócitos obtidos de folículos menores que 6 mm

	Nº ovócitos	Clivagem (% ± D.P.)	D6 (% ± D.P.)	D7 (% ± D.P.)	D8 (% ± D.P.)	Eclosão (% ± D.P.)
Tc	300	70,2±11,7	14,7±9,7	29,0±11,4	31,2±12,2	39,7±11,7
T1	92	69,6±12,9	7,9±8,6	28,8±15,6	31,0±16,9	38,5±27,0
T2	113	70,1±19,2	11,6±11,1	22,7±13,2	24,3±14,1	52,1±25,9

^{a,b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P<0,05$).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

Tabela 2.5– Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8 nos tratamentos Tc, T1, T2, para ovócitos obtidos de folículos maiores que 6mm

	Nº ovócitos	Clivagem (% ± D.P.)	D6 (% ± D.P.)	D7 (% ± D.P.)	D8 (% ± D.P.)	Eclosão (% ± D.P.)
Tc	7	44,4±46,4 ^b	11,1±33,3 ^b	22,2±44,1 ^b	22,2±44,1 ^b	-
T1	165	77,5±19,8 ^a	22,7±14,4 ^a	40,4±18,4 ^a	47,8±21,2 ^a	36,8±25,1 ^a
T2	156	83,5±15,9 ^a	25,6±13,6 ^a	36,5±17,4 ^a	39,1±19,8 ^a	34,8±23 ^a

^{a,b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P<0,05$).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

Quando a média da produção embrionária foi comparada entre os tratamento avaliando conjuntamente ovócitos aspirados de folículos <6 e >6mm (Tabela 2.6), foi constatado que os animais dos grupos T1 e T2 produziram mais embriões ($P<0,05$) do que os do grupo Tc. No entanto a taxa de eclosão não diferiu entre os tratamentos.

Tabela 2.6– Taxas de clivagem, e blastocisto no dia 6 (D6), dia 7 (D7) e dia 8 (D8) de cultivo e taxa de eclosão no dia 8 nos tratamentos Tc, T1, T2, para ovócitos obtidos de folículos menores e maiores que 6mm

	Nº ovócitos	Clivagem (%± D.P.)	D6 (%± D.P.)	D7 (%± D.P.)	D8 (%± D.P.)	Eclosão (%± D.P.)
Tc	307	57,3±35,4 ^a	12,9±23,9 ^a	25,6±31,4 ^a	26,7±31,7 ^a	39,0±12,2 ^a
T1	257	73,5±16,7 ^b	15,3±13,8 ^b	34,6±17,6 ^b	39,4±20,5 ^b	38,7±25,3 ^a
T2	269	76,8±18,4 ^b	18,6±14,0 ^b	29,6±16,6 ^b	31,7±18,4 ^b	35,5±24,1 ^a

^{a,b} Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística (P<0,05).

Tc: Grupo controle.

T1: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH+ LH.

T2: Grupo FSH + 36hs de privação de FSH.

Para monitorar as condições do laboratório foi realizada, simultaneamente aos tratamentos, a PIV utilizando ovócitos obtidos de ovários provenientes de abatedouro. O número total de estruturas foi de 315 ovócitos, sendo que as taxas de clivagem foram de 80,3%, de blastocisto em D6 18,4%, em D7 35,8% e em D8 40,3%.

5.2 Discussão

Este estudo foi realizado visando avaliar o efeito da superestimulação ovariana antes da aspiração folicular nas taxas de produção *in vitro* de embriões. O foco do estudo foi, portanto, estabelecer um protocolo hormonal que proporcione uma maior quantidade de ovócitos mais competentes. De fato, os resultados mostraram que pela estimulação hormonal da onda folicular sincronizada por ablação dos folículos ≥ 5 mm é possível aumentar a quantidade de embriões produzidos *in vitro*.

Alguns fatores, porém devem ser considerados quando se realiza a superestimulação prévia a aspiração folicular, tais como (1) taxa de recuperação, (2) método de sincronização de onda, (3) qualidade ovocitária, entre outros.

Com relação à taxa de recuperação no presente estudo, os resultados mostraram que essa foi influenciada pelo tamanho do folículo (P<0,05), sendo mais baixa em folículos maiores que 6mm (61%) em relação aos folículos menores que 6mm (94,3%).

Outros autores também observaram uma taxa de recuperação menor quando folículos maiores foram aspirados (Blondin et al., 1995; Goodhand et al., 1999; Seneda et al., 2001; De Roover et al., 2005). A melhor eficiência de recuperação de ovócitos ocorre quando os folículos ovarianos apresentam diâmetros menores que 5 mm (Seneda et al., 2005). A taxa global de recuperação ovocitária, ou seja, aspiração dos folículos maiores e menores de 6 mm foi de 78,96%, que é similar aos encontrados na literatura (Manik et al., 2003; De Roover et al., 2005; Durocher et al., 2006).

A menor taxa de recuperação em folículos > 6 mm pode ser devido à dificuldade da aspiração folicular. Apesar dos folículos maiores serem tecnicamente mais fáceis de acessar do que os menores, neste experimento foi observado que a medida que os folículos maiores vão sendo aspirados, a dificuldade de manipulação do ovário pelo técnico aumenta, o que também pode comprometer o resultado da recuperação. O maior volume e a pressão interna do folículo também dificultam a recuperação do ovócito (Goodhand et al., 1999).

Além disso, o colapso da parede do folículo ao redor da agulha pode impedir o fluxo ou envolver o ovócito, dificultando sua recuperação em folículos maiores (Goodhand et al., 1999). O uso de agulha de maior diâmetro com vácuo de aspiração crescente pode aumentar a taxa de recuperação ovocitária. No presente estudo, no entanto foi utilizado vácuo constante de 13 a 15 ml de H₂O/min que pode não ter sido suficiente para melhorar índices de recuperação ovocitária em folículos maiores que 6mm.

A média de ovócitos recuperados por aspiração foi maior no grupo estimulado com FSH em relação ao grupo controle e o estimulado com FSH+LH. Estes resultados diferem dos encontrados por Blaschi et al. (2004), que utilizaram animais Nelore submetidos à única dose de 100 UI de FSH (Pluset[®]) com 48 horas de restrição, e não observaram diferenças entre os tratamentos. Por outro lado Nonato Júnior et al. (2005), trabalhando com fêmeas Nelore e utilizando ablação folicular em D3 (em relação a colocação do implante (D0)) obtiveram taxas de recuperação superiores no grupo controle (29,3 ovócitos) e no grupo tratado com 50mg de FSH (Folltropin) com 36 horas de restrição (24,9 ovócitos) quando comparados ao presente experimento.

Já é conhecido que o folículo dominante exerce influência negativa sobre o crescimento dos folículos subordinados. Quando o mesmo é aspirado, este efeito negativo é eliminado, fazendo com que os folículos em início de atresia retomem o seu crescimento em um prazo aproximado de 12 horas (Beg et al., 2002). Observa-se com

isso, o surgimento de uma nova onda folicular em $1,9 \pm 0,1$ dias (Buratini et al., 2000). A ablação do folículo dominante é, portanto, uma estratégia que pode ser aplicada previamente ao tratamento estimulatório com FSH, com a finalidade de aspiração folicular para a obtenção de ovócitos mais competentes.

Conforme esperado, os grupos FSH+LH e FSH estimulados com múltiplas doses de FSHp apresentaram um maior número folículos com diâmetro acima de 6mm ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. Resultado semelhante foi observado por Bordignon et al. (1997); Sirard et al. (1999); Goodhand et al. (2000); Seneda et al. (2001); Roth et al. (2002); De Roover et al. (2005); Ramos et al. (2006) e Chaubal, et al., (2007).

Segundo vários autores ovócitos oriundos de folículos grandes possuem um maior potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* (Blondin et al., 1997a; Machatkova, et al., 2004; Caixeta et al., 2009). Esse mesmo efeito foi observado no presente experimento, já que os grupos tratados com FSH produziram uma porcentagem maior de embriões que os ovócitos oriundos do grupo controle.

No presente trabalho, não foi observado uma melhoria na quantidade de ovócitos qualidade grau I e II, quando os animais foram submetidos ao tratamento superovulatório, mas foi possível observar um aumento na quantidade de ovócitos mais competentes, ou seja com a capacidade de produzir embriões. Esse fato pode ser comprovado pela maior produção de blastocistos *in vitro* provenientes de ovócitos dos grupos FSH+LH e FSH em comparação ao grupo controle. Esta informação associada aos dados da literatura que verificaram uma melhora da qualidade ovocitária (Sirard et al., 1996; Blondin et al., 1997a; Sirard et al., 1999; Goodhand et al., 2000; Roth et al., 2002; De Roover et al., 2005), sugere a necessidade de uma revisão dos parâmetros morfológicos de avaliação ovocitária atualmente utilizada.

Outros parâmetros podem ser utilizados para avaliar a competência ovocitária. A configuração da cromatina da vesícula germinativa (VG) tem sido muito estudada e pode ter correlação com esta e a capacidade de desenvolvimento de ovócitos em várias espécies de mamíferos (Liu et al., 2006), assim como a coloração supra vital. No entanto esse tipo de avaliação normalmente exige infra-estrutura, capacitação técnica e tempo, não sendo adequados para uso na rotina de campo.

Em animais da raça Gir (*Bos indicus*) submetidos a um protocolo de pré-tratamento com FSH e uma aspiração folicular semanal, obteve-se uma maior porcentagem de ovócitos grau I e uma menor quantidade de degenerados ($P < 0,05$)

(Ramos et al., 2006). No entanto Blaschi et al. (2004) não observaram diferença na qualidade de ovócitos em animais Nelore utilizando dose única de 100 UI (Pluset[®]) e 48 h de restrição. Ueno et al. (2005) em estudo com guzerá, utilizando 100 mg de FSH (Folltropin[®]), durante três dias consecutivos associando ou não a 25 mg de LH 6 horas antes da OPU, que foi realizada 48 horas após a última aplicação de FSH, observaram que o protocolo associado à aplicação de LH proporcionou aumento no número de ovócitos qualidade grau I e II.

Especificamente no grupo controle deste experimento foi observado grande número de ovócitos grau IV obtidos de folículos menores que 6mm. Pelo protocolo utilizado, o intervalo entre o dia da ablação até a aspiração folicular foi de 6 dias, permitindo um padrão de onda folicular com presença de folículo dominante, que foi comprovado e pode explicar este fato efetivamente.

Os resultados encontrados neste estudo mostram que todos os ovócitos, independente do tratamento, fixados e corados após a aspiração se encontravam em estágio de vesícula germinativa. Isso pode ser explicado, pois o tempo necessário para que ocorra a quebra da vesícula germinativa *in vivo* é de 9 a 12hs após o pico de LH (revisado em Hyttel et al., 1997), ou seja maior que seis horas, que foi o tempo entre a aplicação do LH e a aspiração folicular no FSH+LH. Além disso, em todos os grupos tratados o implante intravaginal de progesterona foi retirado somente no momento da aspiração folicular, o que sugere que o pico endógeno de LH não tenha ocorrido devido a altos níveis circulantes de P₄.

Quando a produção embrionária é avaliada em *Bos indicus*, dados da literatura mostraram taxa de clivagem maior (P<0,05) encontrada quando se utiliza protocolo de pré-tratamento com FSH e aspiração folicular uma vez por semana em vacas Gir, entretanto não ocorreu aumento (P= 0,072) na taxa de produção de embriões (Ramos et al., 2006).

Em estudo com a raça Nelore, Satrapa et al., (2005) e Monteiro et al. (2009) avaliaram três protocolos, grupo controle, FSH + 12hs de privação de FSH e OPU (LH 6hs antes), ou FSH + 48hs de privação de FSH (LH 6hs antes) e OPU, e observaram taxas de clivagem e blastocisto semelhantes entre os tratamentos, resultados estes que confirmaram estudo de Blaschi et al., (2004) . No entanto a administração prévia de FSH na aspiração folicular associada a 36hs de restrição aumentou significativamente a taxa de produção embrionária em 10% em relação ao controle (Nonato Junior et al., 2005).

Essa melhora na produção embrionária é relacionada a competência de ovócitos obtidos de folículos maiores, como relatados na literatura (Blondin et al., 1997a; Machatkova, et al., 2004; Caixeta et al., 2009). O momento após o tratamento hormonal em que a OPU é realizada também afeta a competência dos ovócitos para se desenvolver até o estágio de blastocisto (Blondin et al., 1997a). Pois quando doadoras são tratadas com FSHp ocorre um rápido crescimento folicular, que pode ter um efeito negativo sobre a aquisição de competências de desenvolvimento dos ovócitos (Blondin et al., 1997).

Para evitar este efeito negativo, a adição de um intervalo entre a última aplicação de FSH e a aspiração folicular (“Coasting”) fornece ao ovócito um microambiente mais favorável para completar a maturação folicular final (Blondin et al., 1997). A indução de um ambiente folicular pré-ovulatório é necessário para estimular os CCOs a completar a maturação citoplasmática. Em bovinos essa atresia precoce parece imitar em parte a maturação pré-ovulatória resultando em ovócitos competentes (Sirard et al., 1999), de modo que os ovócitos apresentam maior competência mesmo antes de maturar *in vitro*. (Blondin et al., 2002). Blondin et al. (1997; 2002) obtiveram uma produção de até 80% de blastocistos em *Bos taurus*, avaliando diferentes tempos de restrição.

Quando a taxa de eclosão foi avaliada no D8, este índice foi semelhante entre todos os tratamentos considerando ou não o tamanho folicular. Estes resultados vêm confirmar achados em bovinos *Bos taurus* por diversos autores, e diferem dos resultados encontrados em Nelore por Monteiro et al. (2009) e Satrapa et al., (2005), que encontraram taxa de eclosão maior no grupo controle, quando comparado com os grupos tratados.

Em Nelore (*Bos indicus*) especificamente são poucos dados disponíveis na literatura. A grande maioria dos estudos foi realizado em raças européias (*Bos taurus*), e existe portanto a necessidade de se fazer adaptações nos protocolos quanto ao método de sincronização de onda folicular, a dose hormonal, o hormônio a ser utilizado, o intervalo da aplicação de FSH e a aspiração e o melhor momento para a aplicação de LH.

O protocolo proposto neste experimento influenciou a produção de embriões a exemplo dos resultados encontrados por vários autores em *Bos taurus* (Blondin et al., 1997a; Van De Leemput, et al., 1999; Goodhand et al., 2000; Blondin et al., 2002; Chaubal, et al., 2007; De Roover et al., 2008). É evidente, no entanto, que

novos experimentos devem ser realizados para melhorar ainda mais os índices técnicos encontrados, e consolidar esta estratégia na rotina de campo.

No presente estudo, deixando de dar suporte de FSH por 36 h para induzir uma parada progressiva de crescimento folicular, os CCOs foram induzidos a adquirir competência no desenvolvimento *in vivo*. Isto foi observado pelo maior número de embriões produzidos neste experimento e vem confirmar dados de Nonato Junior et al. (2005). Diferente dos resultados de Satrapa et al. (2005), e Monteiro et al. (2009) pois os tempos utilizados nos protocolos anteriormente em Nelore tenham sido muito curtos (12hs) e muito longos (48hs) sendo que 36hs se mostrou eficiente em induzir a competência ovocitária.

Neste estudo o grupo FSH+LH que recebeu a administração de LH 6hs antes da aspiração ficou na MIV por um período reduzido de apenas 18hs em relação ao grupo FSH e controle que permaneceram 24hs. Este período reduzido de MIV pode ter contribuído positivamente para a produção *in vitro* do grupo FSH+LH além da aplicação de LH, porém mais estudos são necessários focando especificamente o tempo de MIV após o período de restrição de FSH e a aspiração dos ovócitos.

Nas condições deste trabalho onde foi utilizado 36hs de privação de FSH com aplicação de LH (30hs) (grupo FSH+LH), foi observada uma produção embrionária total semelhante ($P > 0,05$) a observada no grupo com 36hs de privação de FSH sem LH (grupo FSH). Portanto, este protocolo pode vir a ser utilizado na rotina comercial de PIVE, principalmente em casos de doadoras que produzem números reduzidos de ovócitos ou ovócitos com baixa competência de desenvolvimento *in vitro*.

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi realizado a superstimulação ovariana, associado a 36hs de privação de FSH com ou sem aplicação de LH, foi capaz de aumentar a produção de embriões *in vitro*, de ovócitos aspirados de novilhas Nelore. Portanto a aplicação de FSH na onda sincronizada para aspiração folicular pode ser uma alternativa viável para a produção comercial de embriões *in vitro*. No entanto mais estudos são necessários para estabelecer o protocolo mais adequado para Nelore.

7 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil / Geneal – Genética Animal / FUNARBE – Fundação Artur Bernardes. Nós agradecemos a CAPES pelo apoio financeiro do aluno de pós-graduação, e a UNB através do Programa de Pós Graduação em Ciências Animais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, vol.54, p.19–24, 1994.
- ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.30, p.259-271, 1993.
- ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction Development**, v.37, p.335–44, 1994.
- BARROS, C.M.; FERREIRA, M.M.; POTIENS, J.R.; EBERHARDT, B.G.; MELO, D.S.; MONTEIRO, F.M. Influence of superstimulation and hormonal deprivation protocols on in vitro production of Nelore embryos (*Bos Taurus indicus*). **Reproduction Fertility and Development**, 2006.
- BECKER, F.; KANITZ, W.; NURNBERG, G.; KURTH, J.; SPITSCHAK, M. Comparison of Repeated Transvaginal Ovum Pick Up in Heifers by Ultrasonographic and Endoscopic Instruments, **Theriogenology**, v.46, p.999-1007, 1996.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular-fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120–126, 2002.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.64, p.432–441, 2001.

- BERLINGUER, A. F.; LEONIA, G.; BOGLIOLOB, L.; PINTUSA, P.P.; ROSATIA, I.; LEDDAB, S.; NAITANAA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, v. 61, p.1477–1486, 2004.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p. 13-22, 1997.
- BLASCHI, W.; ANDRADE, E.R.; NONATO JR.; PONTES, J.H.F.; ERENO JR., J.C.; UVO, S.; SENEDA, M.M., Utilização Prévia do Pluset na Aspiração Follicular: Impacto na Produção *In Vitro* de Embriões em Vacas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32(Suplemento), p. 186, 2004 (Abstract).
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.66, p.38–43, 2002.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.-A. In Vitro Production of Bovine Embryos : Developmental Competence is Acquired Before Maturation. **Theriogenology**, v.47, p.1061-1075, 1997a.
- BLONDIN, P.; GUILBAUH, L.A.; SIRARD, M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.43, p. 168, 1995a.
- BLONDIN, P.; GUILBAULTLY, L.A.; SIRARD, M.A. The Time Interval Between FSH-p Administration and Slaughter can Influence the Developmental Competence of Beef Heifer Oocytes. **Theriogenology**, v. 48, p.803-813. 1997.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as detecting characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.1, p.54-62, 1995.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 307–326, 2003.
- BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v.62, p.906–914, 2004.
- BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; DE KRUIF, A. Effects of Aspiration Vacuum and Needle Diameter on Cumulus Oocyte Complex Morphology and Developmental Capacity of Bovine Oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p.1001-1014, 1996.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SEEM, A.; DE KRUIF, A. Effects of Long-Term Treatment with Bovine Somatotropin on Follicular

- Dynamics and Subsequent Oocyte and Blastocyst Yield in an OPU-IVF Program. **Theriogenology**, v. 49, p.983-995, 1998.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.
- BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L.C. GnRH Improves the Recovery Rate and the In Vitro Developmental Competence of Oocytes Obtained by Transvaginal Follicular Aspiration From Superstimulated Heifers. **Theriogenology**, v.48, p. 291-298, 1997.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUA, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.595-604, 2001.
- BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.; RAUBER, L.P.; FIALHO, S.S.; PILLA, L.F.C.; BERNARDI, M.L. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine *in vitro* embryo production, **Animal Reproduction**, v.2. n.1, p.70-73, Jan./March 2005.
- BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of Oocytes From Cattle Via Follicular Aspiration Aided by Ultrasound With or Without Gonadotropin Pretreatment and In Different Reproductive Stages. **Theriogenology**, v. 43, p.667-675,1995.
- BURATINI JR. J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, abr./jun. 2007.
- BURATINI JR. J.; PRICE, LA CA.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421 – 431, 2000.
- CAIXETA, E. S. & DODE, M. A. N. Dissecção folicular: Um Método Eficiente para Estudos de Competência Ovocitária, Brasília-DF (**Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ISSN 0102-0110; 260), 21p., junho 2008.
- CAIXETA, E. S.; RIPAMONTEC, P.; FRANCO, M. M.; BURATINI J.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence, **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p.655–664, 2009.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X., Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v. 67, p.719–728, 2007.

- CHAUBAL, S.A.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; FERRE, L.B.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; RIESEN, J.W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v.65, p.1631–1648, 2006.
- CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D., FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 132–142, 2008.
- CRUZ, F. B.; MARTINS, L. T.; MARINHO, L. S. R.; FORELL, F.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A. Aspira o folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificac o dos o citos em condi es de campo. **Revista de Ci ncias Agroveterin rias**. Lages, v.8, n.2, p. 184-187, 2009.
- DE ROOVER, R., GENICOT, G., LEONARD, S., BOLS, P., DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.13–25, 2005a.
- DE ROOVER, R.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, C.H. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. **Theriogenology**, v. 63, p.1902–1913, 2005.
- DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G. HANZEN, CH. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 239–245, 2008.
- D'OCCHIO M. J.; JILLELLA D.; LINDSEY, B.R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian super stimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, vol.51 p.9-35, 1999.
- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15–23, 2002.
- DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produ o *in vitro* de Embri es na Esp cie Bovina, **Biotecnologia Ci ncia & Desenvolvimento**, n  26- maio/junho 2002.
- DUNN, M. H.; MAYO, K. Gonadotropin Signaling in the Ovary In Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**. v. 1, 3a ed. USA, Elsevier Inc. cap14 p.547-592, 2006.
- DURANTHONN, V.; RENARD J.P. The Developmental Competence of Mammalian Oocytes: a Convenient but Biologically Fuzzy Concept. **Theriogenology**, vol. 55, p.1277-1289, 2001.

- DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. **Theriogenology**, v. 65, p.102–115, 2006.
- EPPIG, J.J. Coordination of Nuclear and Cytoplasmic Oocyte Maturation In: Eutherian Mammals. **Reproduction Fertility and Development**, v.8, p.485-489, 1996.
- EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v.54, p. 546-553, 1996a.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.437-442, 1995.
- FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.406-414, jul./set. 2007.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FRY, R.C.; NIALL, E.M.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J.; REYNOLDS, J. The Collection of Oocytes from Bovine Ovaries. **Theriogenology**, v.47, p. 977-967, 1997.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo Production by Ovum Pick Up From Live Donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p.599-616, 2003.
- GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, v.50, p.575-585, 1998.
- GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; SANTIAGO, L.L.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; et al. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae.**, vol.33, p. 209, 2005 (Abstract).
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M.C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. **Journal Reproduction Fertility**, v.105 181-186, 1997a.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, MC. Emergence and Deviation of Follicles During the Development of Follicular Waves in Cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75 – 87, 1997.

- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.638–647,2001.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, v.62, p.920–927, 2000.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GIOMETTI, I.C.; BERTAGNOLLI, A.C.; ORNES, R.C.; DA COSTA, L.F.S.; CARAMBULA, S.F.; REIS, A.M.; DE OLIVEIRA, J.F.C.; EMANUELLI, I.P.; GONÇALVES, P.B.D. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, p.1014-1025, 2005.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA,R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L.F.S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal**. Livraria Varela, 1 ed., São Paulo, p.195-226, 2001.
- GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In Vivo Oocyte Recovery and In Vitro Embryo Production from Bovine Donors Aspirated at Different Frequencies or Following FSH *Treatment* **Theriogenology**, v. 51 p.951-961, 1999.
- GOODHAND, K.L.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH, **Animal Reproduction Science**, v. 63, p.145–158, 2000.
- HAFEZ, E. S. E., JAINUDEEN, M. R., ROSNINA, Y. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução In. HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B., **Reprodução Animal**, 7^a ed.. São Paulo: Manole, cap. 3, p. 33-53, 2004.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B., **Reprodução Animal**, 7^a ed.. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- HALEY, S.A.; WESSEL, G.M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular Cellular Biology** v.15, p.2084– 92, 2004.
- HENKEL, R. & SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, 2003.

- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in super ovulated cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v. 76, p. 645-656, 1986.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALIESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 23-32. 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Pecuária Municipal. 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>, PPM 2008: acessado em 27 de dezembro de 2009 as 20:00hs.
- KANE, M.T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology, **Animal Reproduction Science**, v.79, p. 171–190, 2003.
- KO, J.C.H.; KASTELIC, J.P.; DEL CAMPO, M.R.; GINTHER, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v.91, p.511-519, 1991.
- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.59, p.103–14, 1998.
- LEEMPUT, E.E.; VAN DE VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Comparison of the developmental potential of in vivo and in vitro matured bovine oocytes in an in vitro test system. **Theriogenology**, v. 45, p. 273, 1996 (Abstract).
- LEME, L.O., Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos in vitro. Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, **Dissertação de Mestrado**, 82p. 2008.
- LI, H.J., LIU, D.J., CHANG, M., WANG, L.M., JIN, M.Z., MA, Y.Z., SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes **Animal Reproduction Science**, v.114, p. 89–98, 2009.
- LIU, Y.; SUI, H.S.; WANG, H.L.; YUAN, J.H.; LUO, M.J.; XIA, P.; TAN, J.H. Germinal Vesicle Chromatin Configurations of Bovine Oocytes. **Microscopy Research and Technique**, v.69, p.799–807, 2006.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In-vitro produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology** , v. 65, p.137-152, 2006.
- MACHACA K: Increased Sensitivity And Clustering of Elementary Ca²⁺ Release Events During Oocyte Maturation. **Development Biology**, v.275, p.170-182, 2004.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and

- force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 1289–1297, 2009.
- MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329–335, 2004.
- MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 155–161, 2003.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition and Development**, vol. 42, p.601–611, 2002.
- MARTINS, C.M.; CASTRICINI E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO M.F.; et al. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 3(Suppl 1), p.286, 2005 (Abstract).
- MCCULLAGH, P. e NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. 2^a ed. Chapman and Hall, Londres, 1989.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrinology**, v.21, p.200–214, 2000.
- MERTON, J.S.; ASK, B.; ONKUNDI, D.C.; MULLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, p. 885–893, 2009.
- MONTEIRO, F.M.; FERREIRA, M.M.G.; POTIENS, J.R.; EBERHARDT, B.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of Superovulatory Protocols on In Vitro Production of Nelore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction Domestic Animals** doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01399.x (*in press*) 2009.
- NAGAI, T. The Improvement Of In Vitro Maturation Systems For Bovine and Porcine Oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p.1291-1301, 2001.
- NEDAMBALE, T.; DINNYÉS, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.62, p.437-449, 2004.
- NONATO JUNIOR, I.; PONTES, J.H.F.; ERENO JR., J.C.; SANCHES, B.V.; SENEDA, M.M. Obtenção de Oócitos e Produção *In Vitro* de Embriões em Vacas Nelore (*Bos Taurus Indicus*) Tratadas com FSH Previamente à Aspiração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33(Suplemento 1), p.369, 2005 (Abstract).

- OLIVEIRA, A. T.; LOPES, R.; RODRIGUES, J. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p.129-136, 2006.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine Oocyte- Diameter in Relation to Developmental Competence. **Theriogenology**, v.48, p.769-774, 1997.
- PALMA, G. Producción in vitro de Embriones Bovinos. In: G. PALMA, **Biotechnología de la Reproducción**. Argentina: INTA, 2001.
- PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 33, p. 257-262, 2004.
- PARRISH, J.J.; KIM, C.I.; BAE, I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, vol.38, p.277-296, 1992.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. In Vitro Capacitation of Bovine Spermatozoa: Role of Intracellular Calcium. **Theriogenology**, v.51, p. 461-472, 1999.
- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction Development** , v.31, p.63-67, 1992.
- PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.63, p. 1131-1141, 2005.
- PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, p.751-762. 1988.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous Behavior and the Estrus-to-Ovulation Interval in Nellore Cattle (*Bos Indicus*) with Natural Estrus or Estrus Induced with Prostaglandin F₂ α or Norgestomet and Estradiol Valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nellore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p. 690-697, 2009.

- RAJKOVIC, A.; PANJAS, S.A.; MATZUK, M.M. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models In Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**. Vol 1, 3a ed. USA, Elsevier Inc. cap 10, p.383-422, 2006.
- RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.341-347, 2006.
- REIS, A.; STAINES, M.E.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; MCEVOY, T.G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 137–151, 2002.
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; WOLFENSON, D. Effect of Treatment with Follicle-Stimulating Hormone or Bovine Somatotropin on the Quality of Oocytes Aspirated in the Autumn from Previously Heat-Stressed Cows. **Journal Dairy Science**, v.85, p.1398–1405, 2002.
- RUBIN, K.C.P.; PONTES, J.H.F.; NONATO JR.; ERENO JR., J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p.183, 2005 (Abstract).
- RUBIN, K.C.P.; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P.; MARQUES, M.O.; SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção in vivo de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004(Abstract).
- RUBIN, KARINA CRISTINA PUGGESI. Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Londrina: UEL, 2006. (**Dissertação de Mestrado em Ciência Animal**).
- RUSSELL, D.F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions, **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 225–240, 2007.
- SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E., Comparison of Ultrasound-Guided Vs Laparoscopic Transvaginal Ovum Pick-Up (Opu) In Simmental Heifers **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.
- SANTOS, R.G.; SOTO, M.A.B.; LOURENÇO, R.X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.; ACCORSI, M.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y.F. Aspiração

- folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**; v. 16, p.79, 2005.
- SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C. M. Morphological Characterization of Follicle Deviation in Nelore (*Bos indicus*) Heifers and Cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382–2394, 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M. C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.1403–1409, 2001.
- SATRAPA, R.A.; FERREIRA, M.M.G.; EDERHARDT, B.G.; MONTEIRO, F.M.; MELO, D.S.; POTIENS, J.R.; BARROS, C.M. Influência de Protocolos de Superestimulação e Privação Hormonal na Produção *In Vitro* de Embriões Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(Suplemento 1), p.404, 2005(Abstract).
- SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K. G.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.106, p. 208–214 (Short communication), 2008.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; ANDRADE, E.R.; BINELLI, M.; MAX, M.C.; OLIVEIRA J.A.; GARCIA, J.M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction**, v.2, n.3, p.178-182, Jul./Sept. 2005.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery, **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.
- SILVA, A.E.D.F.; Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Série Documentos**, n°35, 37p. 1998.
- SIRARD, M. A. Resumption Of Meiosis: Mechanism Involved in Meiotic Progression and its Relation with Developmental Competence, **Theriogenology**, vol.55, p.1241-1254, 2001.
- SIRARD, M.; COENEN, K.; BILODEAU, B. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology** , 37, 39-58. 1992.
- SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle **Animal Reproduction Science**, vol.42 , p. 417-426, 1996.
- SIRARD, M.-A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The Time Interval Between FSH Administration and Ovarian Aspiration Influences the Development of Cattle Oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.699-708, 1999.

- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, vol. 65, p.126–136, 2006.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E., Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography'. **Biology of Reproduction**, v. 39, p.308-317, 1988.
- SNEL DE OLIVEIRA, MARÍLIA VIVIANE. Punção folicular transvaginal em bezerras pré-púberes da raça Nelore: Estimulação hormonal e lesões ovarianas. Brasília: UNB, 2001. (**Dissertação de Mestrado em Agronomia**).
- SOMMERVILLE, J.; LADOMERY, M. Transcrição e mascaramento de mRNA em células germinativas: envolvimento de proteínas y-box. **Chromosoma**, v. 104, p.469-478, 1996.
- THIBIER, M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer- Year 2007: The worldwide activity in farm animals embryo transfer. **Embryo Newsletter**, December, 2008.
- UENO, V.G.; FONTES, R.S.; FONSECA, F.A.; GAMA FILHO, R.V.; BUCHER, C. H.; RAMOS, J.L.G.; CARVALHO, C.S.P.; SHIMOYA, A. Efeito do LH na Qualidade de Ovócitos Obtidos por Meio da OPU em Animais da Raça Guzerá. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33(Suplemento 1), p. 368, 2005 (Abstract).
- VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMANA, S.J. Improved In Vitro Embryo Development Using In Vivo Matured Oocytes From Heifers Superovulated With A Controlled Preovulatory LH Surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; DE SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S.A. Follicular Dynamics in Zebu Cattle **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2501-2509, dez. 2000.
- VIANA, J.H.M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. **O embrião**, Ano X, ed. 42, 2009.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C.A.C.; JUNIOR, A.P.M. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1–12, 2004.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.
- VORONINA, E.; WESSEL, G.M. The Regulation of Oocyte Maturation. **Currents Topics Development Biology**, v.58, p.53-110, 2003.

- WALTER, B. M. T.; SAMPAIO, A. B. A vegetação da fazenda sucupira Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998. 110p.
- WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.; BUNCH, T. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and post-cleavage stage bovine embryos culture in modified CR2 and M199 media. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.37-45, 1997.
- WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENNGHT, B. P.; BOLAND, M. P. Factors Affecting Recovery and Quality of Oocytes For Bovine Embryo Production In Vitro Using Ovum Pick-Up Technology. **Theriogenology**, v.54, p. 433-446, 2000.
- WHITAKER M: Control of Meiotic Arrest. **Rev. Reproduction.**, v.1, p.127-135. 1996.
- XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957,1995.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Effects of gonadotropins and insulinlike growth factors-I and -II on in vitro steroid production by bovine granulosa cells. **Canadian Journal Animal Science**, v.78, p.587-597, 1998.
- YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCEI, G.A. Control of Oocyte Maturation in Cows - Biological Factors **Theriogenology** , v. 49, p.471-482. 1998a.