

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS

TATIMARA MARIA MIYAUCHI

**PROTOCOLOS HORMONAIS DE PREPARAÇÃO DE DOADORAS
BOVINAS PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Alfenas – MG

2011

TATIMARA MARIA MIYAUCHI

**PROTÓCOLOS HORMONAIS DE PREPARAÇÃO DE DOADORAS
BOVINAS PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade José do
Rosário Vellano, como parte das exigências do
Mestrado em Ciência Animal para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Marilu Martins Gioso

Alfenas – MG

2011

Miyauchi, Tatimara Maria

Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para produção de embriões *in vitro*.--Tatimara Maria Miyauchi.

-- Alfenas: Unifenas, 2011.

64f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano.

1. Bovinos. 2. Fêmeas. 3. Hormônios. 4. Aspiração folicular. 5. Oócito I. Título

CDU: 636.2 (043)

TATIMARA MARIA MIYAUCHI

**PROTÓCOLOS HORMONAIS DE PREPARAÇÃO DE DOADORAS BOVINAS
PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Dissertação apresentada como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciência Animal para obtenção do título de *Magister Scientiae*, da Universidade José do Rosário Vellano.

Aprovado em: _____.

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes (Orientador)

Universidade José do Rosário Vellano

Prof.^a Dra. Marilu Martins Gioso (Co-orientadora)

Universidade José do Rosário Vellano

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

EMBRAPA Gado de Leite

A minha irmã Tochimara (Tochinha),

Que sempre está ao meu lado. Não mediu esforços para a realização desta e me impulsionou apesar das dificuldades.

ESSA VITÓRIA É NOSSA.

Amo você!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me deu força, coragem e sabedoria.

Aos meus pais Tochio e Lucimara, meu porto seguro, pessoas admiráveis, que nunca mediram esforços para a realização dos meus objetivos. Amo vocês!

À minha irmã Tochinha, pelo amor incondicional, companheirismo e conselhos. Sua amizade e sabedoria me fizeram realizar coisas admiráveis. Você é muito especial, amo você!

Aos meus queridos vó Ada e tio Dinga, pela fé, amor e presença constante em minha vida. Obrigada por estarem sempre comigo.

Ao meu namorado, Juninho, pelo amor, paciência e incentivo.

Aos meus familiares (Laércio, Dedéia, Letícia, Ana Laura, Lili, tia Cleusa) pelo carinho, apoio e incentivo. Sei que posso contar sempre com vocês.

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pela amizade, orientação, ensinamentos e confiança. A você, minha eterna admiração.

À Prof.^a Marilu Martins Gioso, pela força, ensinamentos, co-orientação e colaboração com a análise estatística.

À BIOTRAN, que cedeu suas instalações e laboratórios para a execução do experimento.

Aos funcionários da BIOTRAN, pela disponibilidade e apoio. Em especial a Bruno Ludgero e Eduardo Ramos pela atenção, disponibilidade e colaboração para a realização do experimento.

Aos proprietários dos animais, que gentilmente os cederam para a obtenção dos dados do experimento.

Aos amigos Edson Dias e Marilu, que me incentivaram para a realização desta.

Ao médico veterinário e amigo Thales Discini Vasconcellos, pelas palavras de fé e incentivo.

Aos amigos do mestrado Dani Perez, Fernando Amorim e aos demais que fizeram parte destes dois anos de muito companheirismo e respeito.

A grande amiga Aline Camargos pelo apoio, amizade e colaboração na reta final.

Ao grande amigo Ribrio, pelos ensinamentos e companheirismo.

A médica veterinária Thaís Camargo Rossi e Adriano Maximiano pela colaboração.

À Universidade José do Rosário Vellano e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários das Ciências Agrárias e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, meu muito obrigada.

Aos animais.

À banca examinadora, pela disponibilidade e presença.

Enfim, a todas aquelas pessoas que fizeram e fazem parte de minha vida e merecem meu profundo agradecimento, MUITO OBRIGADA.

RESUMO

MIYAUCHI, Tatimara Maria. **Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para produção de embriões *in vitro***. Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: UNIFENAS, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Reprodução Animal).

A eficiência na produção *in vitro* de embriões bovinos é limitada pela quantidade e qualidade dos oócitos recuperados na aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Objetivou-se com o presente estudo avaliar os efeitos de diferentes protocolos de sincronização da onda folicular na recuperação de oócitos e produção de embriões bovinos *in vitro*, das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* em diferentes épocas do ano. Foram utilizados trezentos e quarenta e quatro resultados de aspirações foliculares. O regime de manejo dos animais foi o semi- confinamento com balanço energético positivo dez dias antes das aspirações. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: T I ou controle (N=81) - OPU independente do ciclo estral - sem tratamento hormonal prévio; T II (N=97) - Benzoato de Estradiol (3mg), cinco dias antes da OPU; T III (N= 97) - Benzoato de Estradiol (3mg), inserção de implante subcutâneo de Norgestomed e aplicação de D-Cloprostenol Sódico (0,150 mg), quatro dias antes da OPU; T IV (N= 69) - mesmo tratamento utilizado em TIII, acrescido de duas aplicações de FSH (100 a 150 UI) um dia antes da OPU, com intervalo de 12 horas, sendo a OPU realizada de 12 a 16 horas após a última aplicação. Os oócitos viáveis recuperados foram maturados, fertilizados e os prováveis zigotos foram cultivados até o momento da transferência dos embriões. Os animais do grupamento genético zebuíno apresentaram maior recuperação de oócitos viáveis, totais e produção de embriões em relação aos taurinos respectivamente ($14,2 \pm 0,7$ vs $8,8 \pm 0,5$; $17,7 \pm 0,9$ vs $11,9 \pm 0,6$; $4,3 \pm 0,3$ vs $2,1 \pm 0,2$; $P < 0,05$). Houve aumento significativo na qualidade e recuperação de oócitos nos tratamentos III e IV em relação ao controle, respectivamente ($13,2 \pm 1,0$ vs $13,8 \pm 1,1$ vs $8,1 \pm 0,8$; $16,8 \pm 1,2$ vs $17,8 \pm 1,4$ vs $10,7 \pm 1,0$; $P < 0,05$). Em relação à quantidade de embriões totais e qualidade, todos os tratamentos foram superiores ao controle ($P < 0,05$), porém o T IV foi superior aos outros tratamentos de acordo com as raças estudadas ($4,6 \pm 0,6$ e $1,5 \pm 0,3$). Em relação à recuperação de oócitos de acordo com as raças, os tratamentos III e IV recuperaram mais oócitos nos taurinos; o mesmo não foi observado nos zebuínos.

Uma melhor conversão média em embriões foi observada nas fêmeas zebuínas. Nos *Bos indicus* houve melhor recuperação de oócitos no período do verão em relação ao inverno ($15,69 \pm 1,64$ vs $12,04 \pm 1,05$; $19,32 \pm 1,31$ vs $15,30 \pm 1,21$; $P < 0,05$). Fêmeas *Bos indicus* produziram mais embriões nas duas épocas do ano, e no inverno as duas subespécies converteram mais oócitos em embriões em relação ao verão ($41,50 \pm 3,50$ vs $33,12 \pm 2,40$; $28,55 \pm 3,25$ vs $19,48 \pm 2,64$; *indicus* vs *taurus*, respectivamente). Os tratamentos de sincronização foram eficientes para recuperação de oócitos em doadoras taurinas e produção de embriões nas doadoras zebuínas. Quanto à época do ano, foi o inverno o período mais favorável para produção de embriões nas duas subespécies.

Palavras Chaves: Bovinos, Fêmeas, Hormônios, Aspiração Folicular (OPU), Oócitos.

ABSTRACT

MIYAUCHI, Tatimara Maria. **Different protocols to bovine donor preparation for *in vitro* embryo production.** Leader: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: UNIFENAS, 2011. Dissertation (Master in Animal Science, concentration in Animal Reproduction).

Efficiency of *in vitro* bovine embryo production has been affected by low quantity and quality of recovered oocytes from ultrasound-guided follicular aspiration (OPU). The objective of this study was to evaluate the effect of different synchronization of follicular wave protocols in the production of oocytes and embryos *in vitro*, of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* and heifers. We used three hundred forty-four results of follicular aspiration. The management regime was semi-confinement of animals with positive energy balance ten days prior to the aspirations. Animals were randomly distributed in the following treatments: T I or control (N=81) - OPU independent of estrous cycle – with no previous hormone treatment; T II (N=97) - Estradiol benzoate (3mg), four days before OPU; T III (N= 97) - Estradiol benzoate (3mg), insertion of subcutaneous implant of Norgestomed and application of D-Chloprostenol Sodium (0.150 mg), four days before OPU; T IV (N= 69) the same treatment used in T III, plus two doses of FSH (100 to 150 UI) one day before OPU, with an interval of 12 hours, OPU after 12 to 16 hours. Viable recovered oocytes were *in vitro* matured, fertilized and cultured and presumptive zygotes were cultured until the time of embryo transfer. Zebu showed greater recovery of viable oocytes and total production of embryos in relation to taurine respectively (14.2 ± 0.7 vs 8.8 ± 0.5 ; 17.7 ± 0.9 vs 11.9 ± 0.6 ; 4.3 ± 0.3 vs 2.1 ± 0.2). A significant increase in quality and oocyte recovery in groups III and IV in relation to control group, respectively (13.2 ± 1.0 vs 13.8 ± 1.1 vs 8.1 ± 0.8 ; 16.8 ± 1.2 vs 17.8 ± 1.4 vs 10.7 ± 1.0 , $P < 0.05$). In relation to the total quantity and quality of embryos, all treatments were superior to control ($P < 0.05$), but T IV was superior to other treatments according to the breeds studied. Treatments III and IV showed a greater recovered oocyte number in *Bos taurus*; the same was not observed in Zebu. A better average conversion was observed in Zebu cows. *Bos indicus* presented greater quality and recover rate of oocytes in summer compared to winter (15.7 ± 1.6 vs 12.0 ± 1.0 ; 19.3 ± 1.3 vs 15.3 ± 1.2). *Bos indicus* produced more embryos in both seasons and, in winter, both subspecies converted more oocytes into embryos compared with to summer ($41.5 \pm$

3.5 vs 33.1 ± 2.4 ; 28.5 ± 3.2 vs 19.5 ± 2.6). Synchronization treatments were efficient in oocyte recovering of *Bos taurus* donors and *Bos indicus* embryos. Regarding the season of the year, winter has proved to be the most favorable period for conversion of embryos for the two subspecies.

Key words: Bovine, Female, Hormone, OPU, Oocyte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Páginas
Figura 1 - Protocolos para sincronização do desenvolvimento folicular.....	35
Quadro 1- Classificação morfológica dos Complexos <i>Cumulus Oócitos</i> (CCOs).....	37

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 – Influência das subespécies <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i> sobre a recuperação de oócitos provenientes de diferentes protocolos de sincronização de onda folicular (média $\pm$ erro padrão).	40
Tabela 2 – Produção e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> (D7) das subespécies <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i> sincronizadas com diferentes protocolos de emergências foliculares (média $\pm$ erro padrão).	41
Tabela 3 – Recuperação dos oócitos de animais submetidos a diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).	42
Tabela 4 – Desenvolvimento embrionário (D7) de oócitos obtidos de diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).	44
Tabela 5 – Recuperação de oócitos de doadoras <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> em relação aos diferentes protocolos experimentais (média $\pm$ erro padrão).	45
Tabela 6 – Produção de embriões <i>in vitro</i> de doadoras <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i> em relação aos diferentes protocolos (média $\pm$ erro padrão).	46
Tabela 7 – Influência da época do ano nos oócitos viáveis e totais recuperados de animais submetidos a diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).	47
Tabela 8 – Efeito da época do ano em relação à produção <i>in vitro</i> de embriões (média $\pm$ erro padrão).	48
Tabela 9 – Recuperação de oócitos viáveis e totais nos diferentes grupamentos genéticos na época do verão e inverno (média $\pm$ erro padrão).	48

Tabela 10 – Produção média de embriões <i>in vitro</i> nos diferentes grupamentos genéticos na época do verão e inverno (média $\pm$ erro padrão).	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de Estradiol
BVD – Diarreia Viral Bovina
CCOs – Complexos *cumulus-oócitos*
CIV – Cultivo *in vitro*
CL – Corpo Lúteo
E-17 β – Estradiol 17 β
E2 – Estrógeno
FD – Folículo Dominante
FIV – Fertilização *in vitro*
FS – Folículo Subordinado
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA – Inseminação Artificial
IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina
IGF- I – Fator de crescimento semelhante à Insulina
LH – Hormônio Luteinizante
MIV – Maturação *in vitro*
OPU – *Ovum pick-up*
P4 – Progesterona
PGF2 α – Prostaglandina F2 α
PIV – Produção *in vitro* de Embriões
PO – Puras de Origem
TE – Transferência de Embrião

SUMÁRIO

	Páginas
1	INTRODUÇÃO..... 18
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 19
2.1	Dinâmica folicular ovariana e controle neuroendócrino do ciclo estral bovino..... 19
2.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos no Brasil e no Mundo 20
2.2.1	<i>Ovum pick up</i> (OPU)..... 22
2.2.2	Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões bovinos..... 23
2.2.2.1	Importância do oócito e sua qualidade para a PIV..... 24
2.3	Manipulação da Dinâmica Folicular..... 25
2.3.1	Estratégias farmacológicas para manipulação da dinâmica folicular..... 26
2.3.1.1	Estrógenos..... 26
2.3.1.2	Estrógenos associados à progesterona..... 26
2.3.1.3	FSH..... 27
2.3.1.4	PGF 2 α 28
2.4	Diferenças entre fêmeas <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i>..... 29
3	OBJETIVOS..... 32
4	MATERIAL E MÉTODOS..... 33
4.1	Local do experimento..... 33
4.2	Animais..... 33
4.3	Delineamento experimental..... 33
4.4	Aspiração folicular (OPU)..... 35
4.5	Produção <i>in vitro</i> (PIV)..... 37
4.6	Análises estatísticas..... 39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
5.1	Grupos genéticos..... 40
5.2	Efeitos dos tratamentos..... 42
5.2.1	Tratamentos X grupo genético..... 44
5.3	Efeito da época do ano..... 47
5.3.1	Época do ano X grupo genético..... 48
6	CONCLUSÃO..... 50

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
---------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições imprescindíveis para o melhoramento genético dos rebanhos. Neste sentido, especialmente em ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e produção de embriões *in vitro* (PIV) vem sendo utilizadas com sucesso.

A produção e transferência de embriões no Brasil vêm mantendo o crescimento na última década, consolidando o País como referência no emprego de biotécnicas reprodutivas, particularmente a PIV. O maior valor de mercado da genética leiteira, associado ao desenvolvimento de tecnologias como a sexagem de sêmen e a necessidade de laboratórios de ampliar mercados, viabilizaram o aumento no emprego destas na pecuária leiteira (VIANA, 2009). Além do emprego destas biotécnicas em animais saudáveis, possibilitou também a sua utilização em animais com problemas reprodutivos que limitariam a propagação do seu material genético.

Viana *et al.* (2010), ao avaliarem a produção de embriões bovinos no mundo, constataram que 66,6% dos embriões PIV são produzidos no Brasil, tornando o País líder na produção mundial por esta biotecnologia.

Porém, a variação dos resultados da recuperação de oócitos é um grande desafio para a PIV no contexto atual, o que leva à necessidade de pesquisa de novos protocolos de pré- estimulação ovariana na tentativa de otimização do recrutamento, recuperação e qualidade dos oócitos, presumindo um aumento e padronização de oócitos por doadora.

Adicionalmente, a eficiência da PIV ainda é limitada se considerarmos a proporção existente entre a quantidade de blastocistos produzidos em relação ao número de oócitos que são aspirados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dinâmica folicular ovariana e controle neuroendócrino do ciclo estral bovino

Com o desenvolvimento de métodos mais sofisticados para acompanhar os folículos ovarianos, como a ultrassonografia transretal, foi possível visualizar e monitorar sistematicamente a dinâmica folicular (GINTHER, KNOPF e KASTELIC, 1989). Na espécie bovina, a dinâmica folicular ocorre em padrão de ondas, sendo que cada onda é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam a fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER *et al.*, 2003).

Dentre os folículos recrutados em cada onda, apenas um é selecionado (Folículo Dominante - FD) para continuar a crescer sob concentrações limitantes de hormônio folículo estimulante (FSH), iniciando o fenômeno de seleção ou divergência folicular (GINTHER *et al.*, 1999). Isto ocorre quando o folículo selecionado passa a ter uma taxa de crescimento maior que a do segundo maior (Folículos Subordinados – FS), recrutado na mesma onda (GINTHER *et al.*, 2001). Com o aumento da pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH), o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir 17- β estradiol (E-17 β) e inibina aumentam, ocorrendo um decréscimo nas concentrações de FSH. Assim, se estabelece o processo de dominância (GINTHER *et al.*, 1999), ou seja, o folículo selecionado passa a ter capacidade de inibir o crescimento dos demais folículos.

O pico de LH é responsável pela ovulação do folículo, isto ocorre em decorrência da liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que foi estimulado pelo estradiol (E2). As células remanescentes do folículo que ovulou, sofrem um processo denominado de luteinização, formando o corpo lúteo (CL), que produz progesterona (P4). Enquanto a P4 permanece em níveis elevados (5-17 dias) na circulação, ela será a responsável por regular negativamente a liberação de GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias, ou seja, o animal não apresentará estro ou ovulação novamente (FERNANDES, 2000).

Cerca de 15 dias após a formação do CL, caso a fêmea não tenha ficado gestante, iniciar-se-á produção de ocitocina ovariana, que atua no endométrio, induzindo a liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α), que induz a regressão

fisiológica do CL (HAFEZ e HAFEZ, 2004). As concentrações plasmáticas de P4 diminuem devido à luteólise, aumentando gradativamente a secreção de hormônios gonadotróficos, iniciando um novo ciclo (FERNANDES, 2000).

O início da nova onda folicular depende do término da onda que a precedeu. Com a atresia ou ovulação do FD anterior, as concentrações plasmáticas de inibina e E-17 β diminuem, permitindo o aumento da liberação de FSH e consequentemente, levando ao recrutamento de uma nova onda de desenvolvimento folicular (ADAMS *et al.*, 1992).

Em fêmeas gestantes, o embrião em desenvolvimento secreta interferon tau, cuja função é a manutenção da gestação através da inibição de fatores relacionados à luteólise (THATCHER *et al.*, 2001). Posteriormente, o hormônio essencial para a manutenção inicial da gestação é a P4 produzida pelo CL (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

2.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil e no Mundo

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica que vem sendo amplamente utilizada e obtendo grande aceitação no que diz respeito à reprodução animal. Ela consiste na intervenção humana nos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões, em meios específicos e atmosfera controlada, onde simulam artificialmente os processos citados acima.

A técnica é utilizada para estudar a fisiologia dos processos de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário no estágio de pré-implantação, bem como proporcionar o desenvolvimento de outras técnicas como a clonagem e transferência de genes. Além disso, tem sido comercialmente empregada para produzir indivíduos com elevado mérito genético, constituindo-se fonte alternativa em programas de transferência de embriões na espécie bovina (STROUD e MYERS, 1993; LOONEY *et al.*, 1994; HASLER, 1996; HANZEN e GOFFIN, 1998).

Em 1982, um evento muito importante foi relatado por Brackett e seus colaboradores: o nascimento do primeiro bezerro obtido através da produção *in vitro* (PIV) de embriões. Desde então, esta biotecnologia tem perspectivas promissoras, sendo responsável pelo nascimento de expressivo número de produtos (GALLI e LAZZARI, 1996). Sendo assim, a utilização da técnica de *Ovum pick up*/ Produção

in vitro de embriões (OPU/PIV) é uma alternativa de grande utilidade no prolongamento da vida reprodutiva de animais (SOUSA *et al.*, 2007) e estas técnicas são ferramentas valiosas para garantir melhorias significativas na produtividade (FABER *et al.*, 2003).

Enquanto muitos países utilizam a OPU/PIV como última alternativa, quando a recuperação embrionária pela lavagem uterina é inviável, o Brasil muitas vezes a utiliza como primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e/ou comercial, e isto certamente tem relação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional (NONATO JR *et al.*, 2004).

Apesar de as tecnologias de embriões terem sido utilizadas no Brasil inicialmente nas raças taurinas e leiteiras, hoje as raças zebuínas têm a maior participação no mercado nacional de embriões, alcançando 92,4% do total. Também existe maior produção *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo*, 85,5% vs 14,2% (VIANA *et al.*, 2010).

Desta maneira, a PIV se tornou, após 2004, a técnica de eleição para a produção de embriões em raças zebuínas, o que levou o mercado nacional de embriões para um novo patamar (com mais de 200.000 embriões produzidos/ano; VIANA *et al.*, 2010). Esta técnica permite que seja produzida até uma gestação por semana por doadora (BOUSQUET *et al.*, 1999).

Em 2008, 66,6% do total de embriões PIV produzidos no mundo foram no Brasil. Nesse mesmo ano, o Brasil teve 220.425 embriões produzidos *in vitro*, enquanto que, no mundo, a produção de embriões foi de 330.953 (VIANA *et al.*, 2010).

Apesar da expressiva contribuição no emprego desta biotécnica, ela ainda apresenta baixa eficiência nas etapas envolvidas. Diversos estudos em animais não superestimulados relataram recuperação de 70% de *complexos cumulus oóцитos* (CCOs) por aspiração folicular (SENEDA *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2004), e destes, somente 10% a 40% são convertidos em embriões (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006; LONERGAN e FAIR, 2008; RIZOS *et al.*, 2008), obtendo-se taxas de gestação não superiores a 50% (PETERSON e LEE, 2003; PONTES, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2010). Embora haja grande empenho em busca de novos protocolos, condições e meios de cultivos que aprimorem a técnica, as perspectivas são limitadas, principalmente pela qualidade inicial dos CCOs aspirados (BLONDIN *et al.*, 2002; MERTON *et al.*, 2003), visto que o número de

folículos nos ovários aptos à aspiração e qualidade e competência de oócitos recuperados em seu interior são fatores que interferem na eficiência e viabilidade da técnica (VIANA *et al.*, 2010). Outro fator que limita a execução da técnica é o estresse térmico, que parece estar associado à queda nas taxas de fecundação e aumento nas perdas embrionárias (AL-KATANANI *et al.*, 2002).

2.2.1 *Ovum pick up* (OPU)

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU) consiste na remoção mecânica de oócitos contidos em folículos presentes nos ovários de doadoras. A remoção é realizada introduzindo-se um dispositivo de punção com uma guia transvaginal e bomba de vácuo. Com o auxílio de aparelho de ultrassonografia é possível visualizar os folículos, a agulha e o conteúdo aspirado. Após, os oócitos são selecionados, classificados e transportados ao laboratório de PIV (GARCIA *et al.*, 2004).

Esta técnica foi criada por Pieterse *et al.* (1988) e se destacou para a PIV, pois os métodos anteriormente adotados para a recuperação de oócitos eram muito traumáticos, envolvendo até mesmo abordagem cirúrgica dos ovários.

A técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia mostrou-se simples, viabilizando a recuperação, maturação e fecundação de oócitos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal (BOLS *et al.*, 1995; MEINTJES *et al.*, 1995; BOLS *et al.*, 1996). Permite a recuperação de oócitos de doadoras saudáveis, no terço inicial de gestação, com algumas alterações que impossibilitem a monta natural ou TE (KRUIP *et al.*, 1994) e até mesmo em animais falecidos (WATANABE *et al.*, 2008), podendo ser realizada em qualquer fase do ciclo estral, independente do *status* folicular, e produzindo quatro vezes mais embriões em relação à TE (KRUIP *et al.*, 1994), embora com maior custo por embrião (RODRIGUES e GARCIA, 2000).

O número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta considerável variação conforme a dinâmica folicular, sendo o início de onda o momento mais favorável para a recuperação de oócitos, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência de captação dos oócitos a partir de folículos menores (SENEDA *et al.*, 2001; HENDRIKSEN *et al.*, 2004; BACELAR *et al.*, 2010), possibilitando aumento na produção de embriões.

O sucesso das técnicas de OPU e PIV é dependente da população folicular em fase antral (BONI *et al.*, 1997) e disponibilidade de uma população uniforme e competente de oócitos imaturos para serem utilizados na maturação *in vitro* (DODE, 2006) e das variáveis que afetam direta ou indiretamente a eficiência de maturação, fertilização e cultivo de embriões (ARLOTTO *et al.*, 1996; HENDRIKSEN *et al.*, 2000). Estas técnicas são importantes fontes de produção de embriões de doadoras vivas (GALLI *et al.*, 2001).

Para aumentar o número de oócitos viáveis por aspiração, o desenvolvimento folicular tem sido estimulado usando-se hormônios gonadotróficos, aplicados em diferentes esquemas, dosagens e produtos, com resultados variáveis (KAJHARA *et al.*, 1991; TANEJA *et al.*, 2000).

A falta de adequação de protocolos de sincronização, visando a uma maior quantidade e qualidade de oócitos recuperados (SENEDA *et al.*, 2006), a ativação espontânea do ciclo meiótico desde que o oócito é removido do folículo, a sensibilidade a variações de pH e temperatura (PINCUS e ENZMANN, 1935) e as alterações na dieta dos animais (ARMSTRONG *et al.*, 2001) são algumas limitações da OPU/PIV. Essas limitações geram problema logístico que limita a aplicação da técnica a locais próximos aos centros equipados para PIV. Assim, a adequação de protocolos de sincronização e de meios que possibilitem a manutenção da viabilidade dos oócitos e que dispensem o controle de atmosfera durante o transporte são condições importantes para o aproveitamento do potencial desses animais (LEIVAS *et al.*, 2004).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas com intuito de oferecer condições para que os oócitos possam ser transportados a distâncias mais longas sem perder a qualidade e obtendo a máxima conversão, deixando de ser uma limitação e possibilitando o uso desse tipo de biotecnologia em maior escala (LEIVAS *et al.*, 2004).

A crescente necessidade de melhorar a eficiência da técnica e o acréscimo de demanda para situações menos favoráveis (animais com menor produção de oócitos) apontam para um incremento na utilização de protocolos pré aspiração (SENEDA *et al.*, 2006).

2.2.2 Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos

2.2.2.1 Importância do oócito e sua qualidade para a PIV

A capacidade do oócito em sofrer maturação, ser fecundado e produzir um embrião viável e posterior gestação, é definida como a competência oocitária (LONERGAN *et al.*, 2001; SIRARD *et al.*, 2006). Somente os oócitos competentes têm a capacidade de sofrer a fecundação e continuar o seu desenvolvimento embrionário *in vitro*. A qualidade oocitária é de grande importância para o aprimoramento da técnica de PIV, pois permite selecionar, através de avaliação criteriosa, os oócitos competentes para o desenvolvimento *in vitro* (CAIXETA e DODE, 2010).

Fisiologicamente, o oócito bovino, para ser fertilizado, tem que ser proveniente de um folículo sadio. Na OPU, porém, encontram-se oócitos oriundos de diferentes fases e concentrações hormonais distintas que provavelmente impedem que estes atinjam a competência *in vitro*, tendo como consequência a queda na produção embrionária (WIT *et al.*, 2000).

A maioria dos oócitos recuperados são capazes de sofrer a maturação nuclear, porém somente os oócitos competentes se desenvolvem até o estágio de blastocisto; isso ocorre devido ao “status” de maturação citoplasmática e molecular dos oócitos que os diferem em competentes e incompetentes (SIRARD *et al.*, 2006; DONNISON e PFEFFER, 2004).

Um dos critérios para a avaliação de oócitos mais competentes para o desenvolvimento é quanto a sua morfologia (DE WIT, WURTH e KRUIP, 2000; STOJKOVIC *et al.*, 2001). Entretanto, ela, por si só, é insuficiente para distinguir oócitos competentes que têm a habilidade de levar à produção de embriões (LONERGAN *et al.*, 2003; COTICCHIO *et al.*, 2004).

A classificação dos oócitos é baseada na integridade do citoplasma e homogeneidade das células do *cumulus*. Oócitos com *cumulus* intacto podem ser um fator importante na competência oocitária (HORNE, BISHOPC e REEVES, 1996). Relatos demonstram que oócitos circundados por várias camadas de células do *cumulus* apresentam melhor desempenho para a maturação nuclear, fecundação e posterior desenvolvimento *in vitro*, quando comparados com os desnudos (XU *et al.*, 1986; SHIOYA *et al.*, 1988; YANG e LU, 1990; MADISON, AVERY e GREVE, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994; MOMOZAWA e FUKUDA, 1995; STOJKOVIC *et al.*, 2001).

Embora a aparência não assegure a capacidade dos oócitos de se desenvolverem *in vitro*, serve como indicador de sua viabilidade (RIBEIRO, 2009). Isso porque os oócitos dependem do suporte adequado das células do *cumulus*, que têm ligação direta com o ooplasma, permitindo o transporte de nutrientes e sinais que controlam o metabolismo e a maturação nuclear e citoplasmática (HIRSHFIELD, 1991; RICHARDS e MIDGLEY Jr., 1976).

Alguns autores consideram que oócitos que tenham parte de suas células removidas ainda podem ser considerados viáveis (MORENO *et al.*, 1992) ou podem ser sinais de degeneração precoce (TSAFRIRI e BRAW, 1984) e seu desenvolvimento *in vivo* possa terminar em atresia (DOMINGUEZ, 1995).

Desta forma, a avaliação visual quanto à compactação, quantidade, aparência das células do *cumulus* e uniformidade do citoplasma têm sido utilizado como meio de selecionar oócitos e classificá-los qualitativamente (COSTA *et al.*, 1997; MORENO *et al.*, 1993; PAVLOK, LUCAS-HAHN e NEMANN, 1992).

2.3 Manipulação da Dinâmica Folicular

A manipulação da dinâmica folicular com o objetivo de sincronizar o início de uma nova onda, visando ao recrutamento de maior número de estruturas, pode ser utilizada para a obtenção de elevado número de oócitos, para a realização da OPU e, sobretudo, aumentar a eficiência da técnica. Isto é possível desde que se tenha perfeito entendimento da fisiologia do ciclo estral bovino para poder manipulá-lo de forma adequada (BINELLI, IBIAPINA e BISINOTTO, 2006).

A sincronização da emergência da onda folicular tem como objetivo remover o efeito supressivo do folículo dominante e iniciar uma nova onda (BÓ, ADAMS e MAPLETOFT, 2000). Segundo Viana e Bols (2005), o estabelecimento da dominância folicular é o principal fator que afeta a qualidade do *pool* de folículos em desenvolvimento.

A coleta de complexos *cumulus oócitos* (CCOs) no início do ciclo estral (coincidindo com a primeira onda de crescimento folicular), após a sincronização da onda de crescimento ou após a remoção mecânica do folículo dominante, resultaram na recuperação de um maior número de CCOs e/ou em maior potencial de desenvolvimento *in vitro* dos mesmos (MACHATKOVÁ *et al.*, 2000).

A redução do tempo entre coletas sucessivas também tem sido utilizada para minimizar os efeitos da dominância folicular (PETYIM *et al.*, 2003). Entretanto, a constante remoção dos folículos em desenvolvimento, combinada à ausência de CL, pode levar a alterações no perfil endócrino e no padrão de crescimento folicular das doadoras (VIANA *et al.*, 2004).

2.3.1 Estratégias farmacológicas para manipulação da dinâmica folicular

2.3.1.1 Estrógenos

O uso do E2 para sincronizar a onda folicular se baseia em seu efeito supressor do crescimento folicular (BÓ *et al.*, 2002). O mecanismo de supressão do crescimento folicular por parte do E2 envolve a inibição da liberação de FSH. Uma vez metabolizado o estradiol sistêmico, o FSH volta a ser liberado em maior quantidade na circulação e uma nova onda folicular emerge (BÓ *et al.*, 2002).

Os resultados de Miyauchi *et al.* (2010) mostram que a sincronização da onda folicular utilizando benzoato de estradiol (BE) pode melhorar o número e a qualidade dos oócitos recuperados. Caccia e Bó (1998) mostraram que a supressão do crescimento folicular e conseqüentemente o controle sobre a emergência de uma nova onda com o uso de E2 é maior quando este é usado concomitantemente com P4.

2.3.1.2 Estrógenos associados à progesterona

Diversos produtos à base de progestágenos ou P4 associado ao E2 estão disponíveis comercialmente e são utilizados em protocolos de sincronização da dinâmica folicular e estro, tendo como principal função a reposição do CL natural por um artificial, prevenindo assim o estro e a ovulação (WILTIBANK e KASSON, 1968).

Dentre as formas de controle do crescimento folicular, o tratamento com P4 e E2 têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento e a emergência de uma nova onda folicular três a cinco dias após, devido à ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (BÓ *et al.*, 1994; 2006). Esta sincronia ocorre em todos os grupamentos genéticos (CARVALHO *et al.*, 2008), independente da utilização de PGF2 α no início do tratamento.

Estudando os efeitos da associação do E2 e P4 sobre a dinâmica folicular, Bó *et al.* (1993; 1994; 1995) demonstraram que o estradiol exógeno inibe o crescimento do FD, efeito que é mais acentuado quando utilizado associado à P4. O FD de novilhas tratadas com 5mg de E-17 β um dia depois da inserção do implante de progestágeno parou de crescer, entrando em atresia. Após 4,3 $\pm$ 0,2 dias da aplicação do medicamento uma nova onda folicular surgiu (BÓ *et al.*, 1995).

Os análogos do E2, quando administrados na presença de P4 endógena ou exógena, causam a diminuição dos níveis circulantes de FSH, provocando a regressão dos folículos gonadotróficos dependentes. No entanto, quando administrado o E-17 β , sem a associação da P4, o mesmo efeito não foi observado, deixando o início da nova onda imprevisível (BÓ *et al.*, 1996).

Ésteres de estradiol, com meia-vida e composição química distintas, associados a P4, tiveram seus efeitos investigados sobre a dinâmica folicular. Segundo Caccia e Bó (1998), a administração de uma dose de 2mg de benzoato de estradiol (BE) em combinação com 50mg P4 (IM), resultou na emergência de nova onda folicular 4,0 $\pm$ 0,2 dias.

Sá Filho (2006), utilizando diferentes doses (2 ou 3 mg) e /ou momentos (D0 ou D1) da aplicação de BE ou associação de BE mais P4 injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (D0) em vacas Nelore, concluíram que o tratamento com BE+P4 apresentou melhor sincronização de emergência folicular (4,0 $\pm$ 00) comparado com os tratamentos apenas com o BE. Doadoras que receberam implante de P4 e que foram submetidas à aspiração folicular a cada 4 dias, apresentaram mais folículos aptos à punção folicular e consequentemente maior número de oócitos do que as que não receberam tratamento com P4 (PFEIFER *et al.*, 2004; 2005).

2.3.1.3 FSH

A pré- estimulação ovariana com FSH demonstrou ser a alternativa mais consistente para aumentar a qualidade dos oócitos recuperados de vacas zebuínas (VIANA *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2006; BÓ *et al.*, 2010; MIYAUCHI *et al.*, 2010). O FSH exógeno tem suas vantagens, podendo ser utilizado como alternativa para contornar os efeitos negativos do estabelecimento de um FD sobre a recuperação de oócitos por punção folicular (VIANA *et al.*, 2003). Ele aumenta o número e o

diâmetro médio dos folículos disponíveis para punção (GOODHAND *et al.*, 1999) e retarda a seleção do FD e a atresia dos FS (MIHM *et al.*, 1997).

ROOVER *et al.* (2005) propuseram um protocolo de estimulação e adaptação da dose de FSH, tendo como base os resultados obtidos das sessões anteriores de OPU.

Os efeitos da pré- estimulação ovariana pela administração de FSH sobre os resultados da punção folicular, entretanto, são variados (GOODHAND *et al.*, 1999; SIRARD *et al.*, 1999). Há relatos de aumento expressivo no número de folículos disponíveis para a aspiração folicular e aumento da competência de desenvolvimento do oócito (SIRARD *et al.*, 1999; BLONDIN *et al.*, 2002) e Sendag *et al.* (2008) relataram que a estimulação ovariana com FSH afeta positivamente a qualidade dos oócitos obtidos por OPU e, segundo Goodhand *et al.* (2000), aumenta a percentagem de embriões produzidos.

Contrariamente Gibbons *et al.* (1994) e Bungartz *et al.* (1995) relataram não observar aumento no número de oócitos recuperados ou embriões produzidos por doadora por semana. Oócitos de novilhas superovuladas não produziram mais embriões que animais não tratados, fato este supostamente explicado pelo rápido crescimento folicular, indicado pela baixa taxa de atresia. O rápido crescimento folicular induzido pela superovulação poderia ter um efeito negativo na aquisição de competência para o desenvolvimento (BLONDIN *et al.*, 1996).

Looney *et al.* (1994) relataram aumento nos folículos aspirados (12,3 vs 8,9) e oócitos recuperados (8,6 vs 6,2) em doadoras com problemas específicos, tratadas com FSH. Também houve maior produção de embriões viáveis por aspiração, comparando-se com a média de doadoras não tratadas com FSH (1,38 vs 0,96).

Segundo Bousquet *et al.* (1999), oócitos para uso na FIV, coletados a cada duas semanas em doadoras pré- estimuladas com FSH, são uma alternativa valiosa para produzir maior número de embriões e obter maior taxa de prenhez.

2.3.1.4 PGF2 α

A PGF2 α tem sido apontada como agente luteolítico naturalmente responsável pela regressão do CL. Sua ação no controle do ciclo estral se dá pela indução prematura da luteólise, com consequente queda nos níveis plasmáticos de

P4 (COOPER, 1974). O CL dos bovinos possui sensibilidade para PGF2 α , estando esta relacionada ao período do ciclo. Nos bovinos, do 13° ao 20° dia do ciclo estral, verifica-se um aumento da sensibilidade à PGF2 α (RAO *et al.*, 1979).

No processo de aspiração folicular, a aplicação de PGF2 α é importante, pois visa a evitar a presença de corpo lúteo no momento da aspiração folicular (SENEDA *et al.*, 2006) e tem como o objetivo, reduzir o tempo gasto devido à diminuição dos sangramentos decorrentes do processo, facilitando desta maneira, a manipulação dos ovários (MIYAUCHI *et al.*, 2009).

2.4 Diferenças entre fêmeas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*

Existem evidências de que a fisiologia reprodutiva das fêmeas taurinas e zebuínas possui diferenças em relação ao padrão de desenvolvimento da onda folicular, recrutamento folicular, produção de oócitos e consequente produção embrionária *in vitro* e *in vivo* (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2010; BARUSELLI, GIMENES E SALES, 2007).

Também há diferenças no padrão de ondas foliculares entre as espécies, sendo a ocorrência de duas a três ondas por ciclo em *Bos taurus taurus* (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER *et al.*, 1989; WOLFENSON *et al.*, 2004) e maior prevalência de três ondas em *Bos taurus indicus*, sendo relatada a presença de até quatro ondas foliculares (RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000).

Antoniollo (2002) pressupôs que um nível nutricional mais baixo estaria associado à proporção mais alta de ciclos de três ondas foliculares. Contudo, estes fatores têm sido muito discutidos e, aparentemente, não há diferença na fertilidade das vacas com padrão de duas ou três ondas foliculares. Townson *et al.* (2002), discordando de Antoniollo (2002), relata que fêmeas taurinas que apresentam três ondas de crescimento folicular possuem maior fertilidade do que as de duas ondas (81,2 vs 62,5). O mesmo foi observado por Ahmad *et al.* (1997) em fêmeas zebuínas. Esta diferença pode ser explicada pelo menor tempo de crescimento do folículo ovulatório em animais de três ondas, melhorando, assim, a qualidade do oócito.

Além de maior número de ondas foliculares, a espécie *Bos taurus indicus* apresenta maior número de folículos recrutados por onda folicular em relação à *Bos*

taurus taurus, característica esta que tem influência direta na técnica de OPU (33,4±3,2 vs 25,4±2,5; *et al.*, 2007; RUBIN, 2006) e oócitos (GIMENES, 2010), indicando vantagem das fêmeas zebuínas em relação às taurinas. Dominguez (1995), quando comparou animais taurinos (Europeus) com zebuínos (Indianos), encontrou nos taurinos maior número de folículos grandes (>10mm).

Em contrapartida, os animais de genética zebuína são mais adaptados a ambientes tropicais e subtropicais, o que geralmente contribui para o melhor desempenho reprodutivo que os taurinos (CAMARGO *et al.* 2007).

Estudos revelam que o sistema IGF-I (Fator de Crescimento semelhante à Insulina) seja responsável pelo aumento no número de folículos por onda em *Bos taurus indicus* e que esta espécie possui menores concentrações de FSH em relação à *Bos taurus* (ALVAREZ *et al.*, 2000; BARROS e NOGUEIRA, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2009). O IGF é responsável por estimular a função ovariana, agindo de forma sinérgica com as gonadotrofinas, promovendo a esteroidogênese e crescimento folicular (LUCY, 2000).

Dayan *et al.* (1999) relataram altas taxas de recuperação de oócitos viáveis em fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*). Enquanto Dominguez (1995) observou que fêmeas da raça Holandesa possuem melhor recuperação de oócitos quando comparadas com fêmeas zebuínas.

Comparando a produção de oócitos entre raças zebuínas e taurinas, as raças zebuínas têm se mostrado superiores, como descrito por Santos *et al.* (2005): uma recuperação de 564 oócitos em um único procedimento. Miyauchi *et al.* (2010) concluíram que doadoras zebuínas produzem mais oócitos totais e viáveis do que as taurinas ($P<0,05$), considerando um mesmo tratamento. Em diversos estudos, têm sido encontrada uma média de oócitos de 18,6 (RUBIN, 2006), 18,4 (RUBIN *et al.*, 2005), 20- 25 (BLASCHI *et al.*, 2004) e 24,1 (RUBIN *et al.*, 2004). Nonato Jr (2005), utilizando um número maior de animais, encontrou a média de 25,7 oócitos por sessão de aspiração.

Os animais taurinos apresentam médias de oócitos por aspiração folicular relativamente menores. Rubin *et al.* (2005) encontraram 3,7 oócitos por aspiração: Looney *et al.* (1994), 6,3; Garcia e Salaheddine (1998) e Goodhand *et al.* (1999), 5,4±3,7 e 5,6±1,8, respectivamente. Utilizando protocolo hormonal de sincronização da onda folicular cinco dias antes da OPU com implante de P4, D-Cloprostenol, BE e um dia antes da OPU, FSH dividido em duas doses com 12 horas de intervalo,

observou-se que este protocolo foi eficiente para aumentar o número de oócitos viáveis e totais das fêmeas taurinas. Já nas zebuínas, houve um aumento apenas dos oócitos viáveis (MIYAUCHI et al., 2010).

A produção embrionária, de acordo com Viana *et al.* (2004), em doadoras Gir, foi de 7,8 embriões viáveis/ aspiração, em média. Rubin *et al.* (2006), em doadoras Nelore, alcançaram média de 5,1 embriões/ sessão.

Estes dados sugerem que existem diferenças na fisiologia ovariana entre as subespécies e isto pode afetar a produção de embriões *in vitro*.

3 OBJETIVOS

Avaliar e comparar os efeitos de protocolos distintos de sincronização da onda de desenvolvimento folicular e estímulo com FSH em fêmeas bovinas, avaliar os efeitos do grupamento genético *taurus/ indicus* e a época do ano inverno/ verão sobre o número e qualidade de oócitos aspirados via OPU, e a posterior produção de embriões *in vitro* (PIV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

Os dados se referem a aspirações foliculares realizadas em propriedades rurais localizadas na região Sul do Estado de Minas Gerais, durante um período de 15 meses, compreendidos entre novembro de 2007 e janeiro de 2009. A região possui clima mesotérmico de classificação Cwa, segundo classificação Koppen (KÖPPEN e GEIGER, 1928).

4.2. Animais

Foram utilizados resultados de 344 aspirações foliculares em fêmeas das subespécies *Bos taurus taurus* (Holandesa, Jersey e Red Angus) e *Bos taurus indicus* (Gir, Nelore, Brahman e Guzerá) sendo estas manejadas em regime de semiconfinamento, com balanço energético positivo a partir dos 10 dias anteriores às aspirações foliculares. Este balanço energético foi conseguido de acordo com a disponibilidade de forragens verdes, silagem e/ou ração balanceada, de acordo com a época do ano. A suplementação concentrada foi composta principalmente de milho e soja e a suplementação mineral *ad libitum*. Todas as doadoras foram submetidas a manejo sanitário satisfatório.

As doadoras passaram por exame ginecológico prévio, utilizando-se de palpação transretal e ultrassonografia, com aparelho portátil de ultrassom, Esaote® modelo Falco e com transdutor linear de 5/ 7,5MHz, visando a detectar alguma anormalidade que poderia desqualificá-las para o uso da técnica de aspiração folicular.

4.3 Delineamento experimental

As aspirações foliculares foram realizadas por um mesmo médico veterinário a fim de, evitar possíveis variações individuais. Os animais foram distribuídos pelos seguintes tratamentos:

Tratamento I – Controle (N= 81): Aspiração folicular independente do dia do ciclo estral e sem qualquer tratamento hormonal prévio.

Tratamento II – (N= 97): Onda de desenvolvimento folicular sincronizada com 2 a 3 mg de BE¹, cinco dias antes da aspiração folicular, levando à atresia dos folículos existentes e consequentemente o início de nova onda de desenvolvimento folicular (Figura 1).

Tratamento III – (N= 97): Onda de desenvolvimento folicular sincronizada e sem CL. Neste tratamento, as doadoras foram sincronizadas com a aplicação de 2 a 3 mg de BE¹, cinco dias antes do processo de aspiração. Neste mesmo dia, foi colocado um implante subcutâneo de Norgestomed² e aplicado 0,150 mg de D-Cloprostenol³ (Figura 1).

Pretendeu-se, com o protocolo utilizado no TIII, evitar a presença de um CL no momento da aspiração folicular administrando PGF2 α , pois este hormônio induz a regressão do CL e reduz a perfusão vascular, levando a menor captação de sangue (SENEDA *et al.*, 2006; BACELAR *et al.*, 2010; MIYAUCHI *et al.*, 2009).

A administração de BE + P4 visou a sincronizar a onda de desenvolvimento folicular para que, no momento da aspiração, houvesse um maior número de folículos em condições de serem aspirados e com oócitos de qualidade no seu interior, pois, segundo a literatura, o BE associado à P4 tem capacidade de provocar atresia folicular generalizada e crescimento de uma nova onda folicular 3-5 dias após o início do tratamento (BÓ *et al.*, 1994, 2006; CACCIA e BÓ, 1998).

Cerca de dois dias após a emergência da onda, foi realizada a aspiração folicular, pois neste período a dominância folicular (e atresia) ainda não se estabeleceu, e os folículos desta nova onda já aumentaram de volume o suficiente para serem identificados na imagem ultrassonográfica.

O implante auricular de P4 visou a manter altos os níveis sanguíneos de progestágenos, para suprimir a liberação endógena do LH (BARUSELLI *et al.*, 2004) pois, quando esta fonte é o CL, o ovário onde o mesmo se encontra está muito vascularizado.

Tratamento IV – (N= 69): Onda de desenvolvimento folicular sincronizada e sem CL e com estímulo do desenvolvimento folicular. Neste tratamento, os animais receberam o mesmo protocolo do Tratamento III, acrescido de duas aplicações de

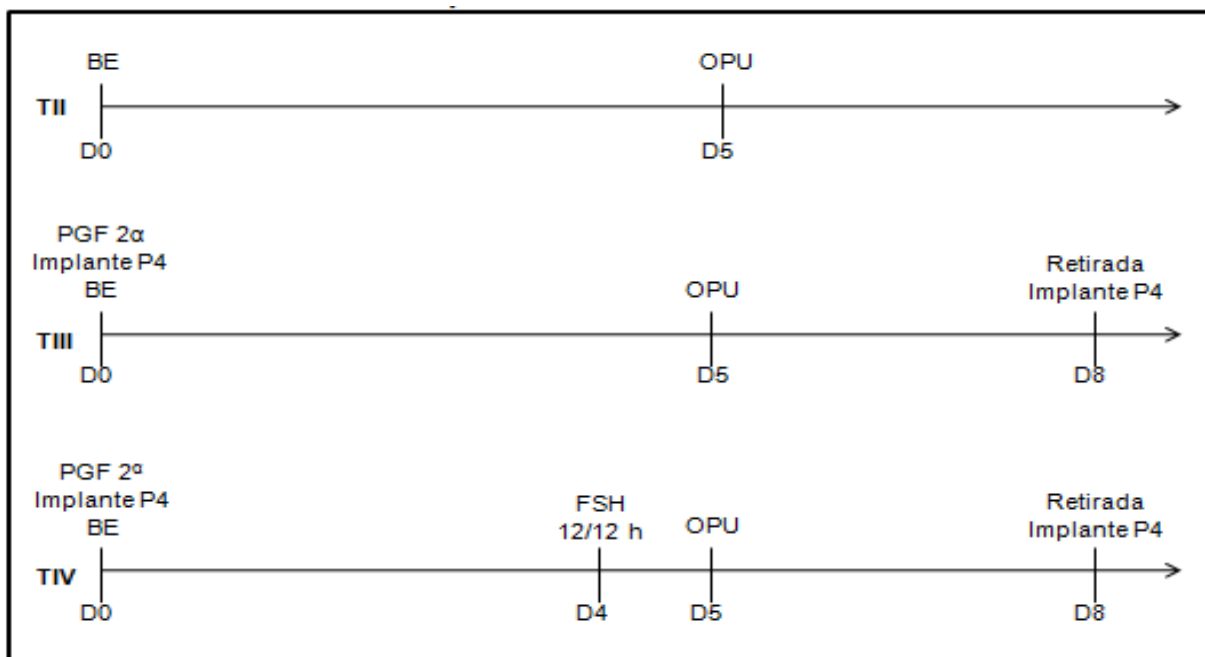
¹Gonadiol®- Intervet Schering- Plough Animal Health

²Crestar®- Intervet Schering- Plough Animal Health

³Veteglan®- Hertape Calier Saúde Animal S.A.

FSH⁴, num total de 100 UI (Zebuino) a 150 UI (Taurino), de acordo com o grupamento genético. Neste caso, as aplicações de FSH foram realizadas quatro dias após o início do protocolo, com intervalos de 12 horas. A aspiração folicular foi realizada de 12 a 16 horas após a última aplicação de FSH (Figura 1).

Figura 1: Protocolos para sincronização do desenvolvimento folicular.



O objetivo do tratamento IV foi o mesmo relatado em relação ao Tratamento III, ou seja, reduzir a possibilidade de atresia folicular (SIRARD *et al.*, 1999) e aumentar o diâmetro dos folículos viáveis. Com o incremento de uma fonte exógena de FSH para a estimulação do desenvolvimento folicular (GIBBONS *et al.*, 1997). Desta forma, os folículos foram mais facilmente identificados e aspirados pelo operador. Além disso, a administração de FSH melhorou a qualidade dos oócitos recuperados e aumentou a percentagem de embriões transferíveis (GOODHAND *et al.*, 1999; 2000).

Para o efeito de variação sazonal foram considerados os meses de verão, janeiro/ abril e novembro/ dezembro e o inverno, maio a outubro.

4.4 Aspiração folicular (OPU)

⁴ Pluset®- Hertape Calier Saúde Animal S.A

Os animais foram contidos em brete, onde foram retiradas as fezes do reto e realizada limpeza e desinfecção do períneo com água e álcool 70°. A antisepsia do local para realizar a anestesia epidural foi feita com álcool 70°. O fármaco para a anestesia epidural foi a Lidocaína 1%⁵, administrada em seringa⁶ 5ml com agulha⁷ 30x8mm. O objetivo da anestesia epidural foi evitar desconforto do animal e movimentos peristálticos.

As punções foliculares foram realizadas com intervalos mínimos de 30 dias, utilizando-se aparelho de ultrassonografia de marca ESAOTE modelo Falco®, equipado com transdutor setorial microconvexo intravaginal de 5-7,5 MHz e dispositivo guia para punção folicular, além de bomba de vácuo da marca Watanabe Tecnologia aplicada (WTA). O ovário foi posicionado através da manipulação retal na extremidade do transdutor. Os folículos, a introdução da agulha e a aspiração do conteúdo folicular foram visualizados na tela do aparelho.

Folículos com diâmetro superior a 3 mm foram identificados e puncionados utilizando agulhas⁸ 20 G descartáveis e pressão de vácuo de 80 mm Hg, correspondendo a um fluxo aproximado de 14 ml de água/minuto. O líquido folicular aspirado foi inicialmente recuperado em tubos⁹ de 50 ml, contendo de 10 a 15 ml de DMPBS Flush¹⁰ (veículo q.s.p.100ml) com Gentamicina¹¹ (0,005g), acrescido de 1% de Heparina, sendo os oócitos posteriormente separados em filtros¹² de coleta de embriões com malha de 70µm. Os CCOs recuperados foram transferidos para placas de cultivo¹³ 60X15mm contendo meio DPBS Flush onde foram selecionados, contados e classificados com base em seu aspecto morfológico, com uso de estereomicroscópio com aumento de até 40 vezes, conforme descrito por Viana *et al.* (2004) no quadro 1.

⁵ Lidovet®- Bravet

^{6,7,8} Injex®

^{9,14} Corning®

^{10,11,12} Nutricell® Nutrientes Celulares

¹³ Emcom, Nutricell® Nutrientes Celulares

Quadro 1: Classificação morfológica dos *Complexos Cumulus Oócitos*.

Classificação dos CCOs	Células do <i>Cumulus</i>	Citoplasma
GI (Grau I)*	> 3 camadas Compactas	Homogêneo
GII (Grau II)*	3 camadas Compactas	Heterogêneo (levemente)
GIII (Grau III)* ou parcialmente desnudo	3 camadas remoção de menos de 1/3	
Desnudo ou degenerado	Sem células na parte da zona pelúcida	Retração e vacuolização
<i>Cumulus</i> expandido ou Atrésicos	Expansão	

* GI, GII e GIII se referem à qualidade dos oócitos. São considerados oócitos viáveis.

Fonte: Viana *et al.* (2004).

Após a classificação, os oócitos foram transferidos para criotubos¹⁴ de 1,2ml, contendo meio TCM- 199¹⁵, acrescido de 5% de gás carbônico (CO₂), transportados em incubadora portátil (Bioceler, modelo INC2040 – R1) até o laboratório de PIV.

4.5 Produção *in vitro* (PIV)

Os oócitos iniciaram seu desenvolvimento *in vitro* em situações que simulam artificialmente os processos biológicos do aparelho reprodutor da fêmea doadora bovina (maturação, fertilização e cultivo).

Após a chegada ao laboratório, os oócitos foram transferidos para placas de maturação onde permaneceram até completar o período de 24 horas após o início da aspiração a uma temperatura de 38,5⁰ C, 5% de CO₂ e umidade saturada.

O sêmen a ser utilizado na FIV foi descongelado a uma temperatura de 35⁰ C e avaliado quanto a sua motilidade e vigor. Os espermatozoides vivos e mortos foram separados por gradiente de densidade antes de serem utilizados para a FIV. A FIV foi realizada por 18 horas em estufa incubadora em atmosfera controlada. Após a FIV, os possíveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro*, onde permaneceram por sete dias em temperatura e atmosfera controlada.

¹⁶Gibco®

Decorridos os sete dias da fecundação, foram realizadas as avaliações dos embriões de cada grupo, sendo classificandos em mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) ou blastocisto eclodido (BE), utilizando-se a classificação dos embriões recomendada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Apenas os embriões de Grau I (IETS) de todas as categorias (MO, BI, BL, BX e BE) foram inovulados em receptoras sincronizadas.

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram digitados em planilhas eletrônicas e submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa SAEG (Ribeiro Junior, 2001). As variáveis referentes à qualidade e número de oócitos e/ou embriões em relação aos tratamentos, épocas do ano e raças, foram avaliados para normalidade e homocedasticidade.

Posteriormente, estas variáveis dependentes foram analisadas pelo teste ANAVA (análise de variância) e, no caso de significância entre os tratamentos, utilizou-se o teste de médias de Duncan. Considerou-se em toda a avaliação o nível de significância a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Grupos Genéticos

A tabela 1 representa os dados referentes à recuperação de oócitos provenientes de diferentes protocolos de sincronização de onda folicular.

Tabela 1: Influência das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* sobre a recuperação de oócitos provenientes de diferentes protocolos de sincronização de onda folicular (média $\pm$ erro padrão).

Raça	N	GI	GII*	GIII*	Viável*	Atrésico	Desnudo*	Total*
Btt	168	0,6 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 0,6
Bti	176	0,7 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,2	10,5 $\pm$ 0,7	14,2 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,9
Total	344	0,6 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	14,9 $\pm$ 0,6

* Diferença estatística por Anava (P 0,05). G significa Grau; I, II e III correspondem à qualidade dos oócitos. N refere-se ao número de animais. Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*.

Houve diferença entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à quantidade de oócitos totais e viáveis recuperados (TAB. 1).

A média de oócitos viáveis por aspiração obtida, neste experimento (11,6 $\pm$ 0,5), foi acima da encontrada em diversos estudos, como pode ser observado por Sousa *et al.* (2007), com média de 5,9 $\pm$ 4,88; Bousquet *et al.* (1999), com média de 9,5 $\pm$ 5,6; Galli *et al.* (2001), com 9,9 oócitos por aspiração; Faber *et al.* (2003), com média de 7,63 oócitos; e Merton *et al.* (2003), que obtiveram 7,9 oócitos por animal.

Diferenças no recrutamento folicular e recuperação de oócitos são relatadas entre indivíduos e grupamentos genéticos (BONI *et al.*, 1997). Uma das explicações para estas diferenças no PIV nos determinados grupamentos genéticos seria a quantidade de folículos presentes na reserva ovariana, porém estas podem ser influenciadas nos animais de produção por variáveis como manejo, nutrição, categoria, idade dos animais, condições ambientais, condição corporal (VIANA e BOLS, 2005) e dieta, pois, segundo Armstrong *et al.* (2001), vários nutrientes acrescidos na dieta interferem na função ovariana, principalmente, sobre a fase de crescimento folicular e a qualidade oocitária.

Pontes (2009), avaliando a produção de oócitos de doadoras Gir e Holandesa sem estimulação hormonal, encontraram resultados semelhantes aos do

presente estudo, $17,1 \pm 4,5$; $12,1 \pm 3,9$ e $11,4 \pm 3,9$; $8,0 \pm 2,7$, média de oócitos totais e viáveis, respectivamente, para *indicus* e *taurus* por sessão de OPU.

Não está totalmente elucidado porque bovinos *Bos taurus indicus* possuem mais folículos no início da onda folicular. Há evidências de que os fatores responsáveis são a insulina e concentrações de IGF- I que, por sua vez, diferem de *Bos taurus taurus* (MONTEIRO *et al.*, 2009). Barros e Nogueira (2001) têm sugerido que o IGF-I pode melhorar a resposta ovariana em vacas zebuínas pelo fato de esta raça exigir uma dose inferior de FSH para indução ovariana quando comparada à européia.

Vacas Brahman apresentam maiores concentrações de IGF-I no plasma; em contrapartida, vacas Angus têm menores concentrações (ALVAREZ *et al.*, 2000). Postula-se que o aumento no número de folículos, apesar das menores concentrações de FSH em gado zebuino, pode ocorrer devido a maiores concentrações de IGF-I (MONTEIRO *et al.*, 2009).

Outra hipótese seria a de que o maior número de oócitos advém de uma maior população de folículos pré- antrais, em comparação com *Bos taurus taurus* (RUBIN, 2006). E, uma última teoria, seria a de que o período da multiplicação de células germinativas ocorre de maneira diferenciada para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, ou seja, o término da multiplicação celular seja mais tardio em fêmeas Nelore (RUBIN, 2006).

Tabela 2: Produção e desenvolvimento embrionário *in vitro* (D7) das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* sincronizadas com diferentes protocolos de emergências foliculares (média $\pm$ erro padrão).

Raça	N	Embriões (D7)*	MO	Bi*	BL*	BX	BE	Conversão (%)
Btt	168	$2,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,01$	$18,2 \pm 1,6$
Bti	176	$4,3 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$0,0 \pm 0,01$	$26,4 \pm 1,8$
Total	344	$3,2 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$22,4 \pm 1,2$

* Dados na mesma coluna diferem por Anava (P 0,05). Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*. Conversão (%)- Embriões/oócitos viáveis.

No que se refere à produção de embriões totais (tabela 2), houve diferença em *Bos taurus taurus* ($2,10 \pm 0,21$) em relação a *Bos taurus indicus* ($4,29 \pm 0,33$; $P < 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Pontes (2009): 2,1 e 3,2; $P < 0,05$, sem estimulação hormonal. A maior produção de embriões em Zebu está relacionada a dois fatores: maior recuperação de oócitos nessa subespécie e a

melhor taxa de conversão de oócitos em blastocistos (D7). Dados que também foram observados por Watanabe *et al.* (2008) em escala comercial, quando compararam zebuínos em relação aos taurinos: 32.1% vs 25.6%, respectivamente; ($P < 0,001$).

5.2 Efeito dos tratamentos

Tabela 3: Recuperação dos oócitos de animais submetidos a diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).

T	N	GI	GII	GIII	Viável	Atrésicos	Desnudos	Total
TI	81	0,4 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2b	5,8 $\pm$ 0,7c	8,1 $\pm$ 0,8c	1,0 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 1,0c
TII	97	0,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,3b	8,2 $\pm$ 0,6bc	11,2 $\pm$ 0,8bc	1,2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,9bc
TIII	97	0,6 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,4 ^a	9,6 $\pm$ 0,9ab	13,2 $\pm$ 1,0ab	1,7 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 1,2ab
TIV	69	0,9 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,3ab	10,6 $\pm$ 1,0a	13,8 $\pm$ 1,1 ^a	1,5 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	17,8 $\pm$ 1,4 ^a
Total	344	0,6$\pm$0,1	2,5$\pm$0,1	8,5$\pm$0,4	11,6$\pm$0,5	1,4$\pm$0,1	1,9$\pm$0,1	14,9$\pm$0,6

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$). G significa Grau; I, II, III corresponde à qualidade dos oócitos. N (número de animais). T- Tratamentos.

A aplicação de BE isoladamente (TII) não melhorou a produção média de oócitos viáveis e totais em relação ao controle.

Em relação aos tratamentos TI e TII, a tabela acima mostrou que não foram observadas diferenças na produção de oócitos. O BE aplicado em TII talvez não tenha sido capaz de sincronizar a onda de desenvolvimento folicular isoladamente, sem a presença de P4. Devido a isto, provavelmente os animais destes dois grupos se encontravam, no momento da aspiração, em diferentes estágios de desenvolvimento folicular, a maioria no início da onda, onde os folículos estavam pequenos demais para serem aspirados, e outros, após a fase de dominância, onde parte dos folículos já iniciou a atresia.

Houve aumento significativo de oócitos viáveis e totais de TIII e TIV em relação a TI ($P < 0,05$). Nos protocolos TIII e TIV a PGF2 α foi utilizada para evitar a presença de um CL, previamente à OPU (SENEDA *et al.*, 2006; MIYAUCHI *et al.*, 2009). Segundo Dominguez (1995), ovários contendo CL rendem número menor de oócitos aptos à utilização na PIV.

Além da ausência do CL e devido à ação conjunta de BE e P4, pode ter havido a regressão de todos os folículos anteriormente à aspiração o que, conseqüentemente, acarretou o início de uma nova onda folicular. Segundo estes

autores, o início de nova onda ocorre em média quatro dias após o início do protocolo (CACCIA e BÓ, 1998 e SÁ FILHO, 2006).

Segundo Pfeifer *et al.* (2005), o uso de P4 exógena aumenta o número total de oócitos recuperados, bem como o número de oócitos grau I e II e o número de folículos disponíveis para aspiração folicular.

O número de oócitos viáveis e totais foi maior em TIV que em TI e TII.

Os resultados de oócitos viáveis ($13,2 \pm 1,0$; $P < 0,05$) do TIII estão de acordo com Miyauchi *et al.* (2010), que encontraram $16,97 \pm 6,47$ oócitos viáveis com o mesmo protocolo ($P < 0,05$). No TIV, os resultados se assemelharam aos encontrados por Ribeiro (2009) que, utilizando pré- estimulação com FSH após sincronização da onda folicular, encontrou uma média de $10,35 \pm 7,27$ ($P > 0,05$). Sendag *et al.* (2008) e Merton *et al.* (2003) sugeriram que a resposta ovariana, o número de folículos presentes nos ovários, número de oócitos e sua qualidade são melhores em animais tratados com FSH.

Folículos recrutados de cada onda dependem de FSH para o seu desenvolvimento, que, por sua vez, flutua ao longo do ciclo estral em função do estabelecimento e regressão dos folículos dominantes (GINTHER *et al.*, 1999). O FSH exógeno tem efeito sobre a sincronização da população folicular, avançando o desenvolvimento dos folículos *in vivo* (GIBBONS *et al.*, 1994) e compensando esta flutuação, garantindo um aporte gonadotrófico apropriado para o desenvolvimento folicular, resultando em aumento na taxa de crescimento e/ou redução na taxa de atresia dos folículos subordinados e na melhor qualidade dos oócitos (VIANA *et al.*, 2003).

A utilização de FSH pode ter melhorado a qualidade morfológica dos oócitos por reduzir a população de folículos atrésicos (BLONDIN *et al.*, 1996) e aumentar o diâmetro folicular. Ramos *et al.* (2006) concluíram que a pré- estimulação ovariana antes da OPU pode melhorar a qualidade e taxa de clivagem dos oócitos recuperados de doadoras Gir após a OPU. Há afirmações contraditórias ao presente estudo, que relataram que a terapia gonadotrófica promove a diminuição da recuperação de oócitos (GOODHAND *et al.*, 1999; SIRARD *et al.*, 1999), insuficiente para incrementar o número e qualidade de oócitos viáveis, consequentemente não resultando em melhorias na PIV.

Tabela 4: Desenvolvimento embrionário (D7) de oócitos obtidos de diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).

T	N	Embriões (D7)	MO	Bi	BL	BX	BE	Conversão (%)
TI	81	1,5 $\pm$ 0,3c	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1c	0,5 $\pm$ 0,1b	0,6 $\pm$ 0,2b	0,0 $\pm$ 0,0	14, 5 $\pm$ 2,4b
TII	97	3,5 $\pm$ 0,3b	0,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1 ^a	1,1 $\pm$ 0,2b	1,1 $\pm$ 0,2b	0,0 $\pm$ 0,0	26,4 $\pm$ 2,3 a
TIII	97	3,3 $\pm$ 0,4b	0,1 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1b	1,2 $\pm$ 0,2b	1,3 $\pm$ 0,2b	0,0 $\pm$ 0,0	21,3 $\pm$ 2,1ab
TIV	69	4,6 $\pm$ 0,6 ^a	0,1 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,2 ^a	1,6 $\pm$ 0,3 ^a	1,7 $\pm$ 0,3 ^a	0,0 $\pm$ 0,0	27,5 $\pm$ 2,8 a
Total	344	3,2$\pm$0,2	0,1$\pm$0,0	0,9$\pm$0,1	1,1$\pm$0,1	1,1$\pm$0,1	0,0$\pm$0,0	22,4$\pm$1,2

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Anava (P 0,05). T- Tratamentos. Conversão (%)- embriões /oócitos viáveis.

Todos os tratamentos (TII, TIII e TIV) foram superiores ao controle em relação à produção total de embriões.

O tratamento TIV produziu mais embriões totais, Blastocistos (BL) e Blastocistos Expandidos (BX); $P < 0,05$, que os outros grupos (tabela 4). Isto pode ter ocorrido pelo fato de que, embora nem sempre a classificação morfológica dos oócitos tenha mostrado diferença em relação aos demais grupos, provavelmente, de forma intrínseca, neste grupo estes oócitos eram de melhor qualidade, levando a uma maior produção embrionária e a embriões mais desenvolvidos, pois, segundo Lonergan *et al.* (2003), e a qualidade intrínseca do oócito é fator chave para determinar a taxa de blastocisto.

O FSH é benéfico para o desenvolvimento embrionário por sincronizar a população folicular, acarretando o aumento da competência de desenvolvimento do oócito antes da recuperação dos mesmos (GIBBONS *et al.* 1994).

No presente estudo houve número relativamente maior de embriões em animais superestimulados com FSH (4,63 $\pm$ 0,57); ($P < 0,05$), concordando com alguns autores que afirmam que tratamentos com FSH resultam em maior número de embriões produzidos (GOODHAND *et al.*, 1999; ROOVER *et al.*, 2005; GOODHAND *et al.* 1999, 2000). Ribeiro (2009) não encontrou melhorias na PIV de embriões bovinos com a administração prévia com FSH.

5.2.1 Tratamentos x Grupo Genético

Tabela 5: Recuperação de oócitos de doadoras *Bos taurus* e *Bos indicus* em relação aos diferentes protocolos experimentais (média± erro padrão).

Total oócitos					Oócitos viáveis			
T	N	Bti	N	Btt	N	Bti	N	Btt
I	29	18,1±1,8 ^{A12}	54	7,8±0,8 ^{B1}	29	14,8±1,5 ^{A12}	54	5,4±0,6 ^{B1}
II	61	20,5±1,8 ^{A1}	39	11,8±1,2 ^{B12}	61	16,6±1,4 ^{A2}	39	8,4±0,9 ^{B12}
III	61	15,6±1,5 ^{A2}	39	12,7±1,5 ^{A2}	61	12,5±1,3 ^{A1}	39	9,8±1,2 ^{A2}
IV	27	14,4±1,8 ^{A2}	44	14,3±1,3 ^{A2}	27	10,9±1,7 ^{A1}	44	10,9±1,1 ^{A2}
Total	178	17,1±1,7	176	11,6±1,2	178	13,7±1,4	176	8,6±0,9

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente por Anava (P< 0,05).

^{1,2} Números diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Anava (P< 0,05).

T- Tratamentos. Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*.

A tabela 5 mostra que em média os animais zebuínos produzem mais oócitos totais e viáveis que os taurinos. Com relação aos tratamentos em um mesmo grupo genético, os tratamentos III e IV foram mais eficientes em relação ao controle para recuperação de oócitos totais e viáveis apenas nos animais taurinos. A utilização de gonadotrofinas se mostrou mais eficiente principalmente em fêmeas taurinas por responderem melhor a tratamentos completos.

Perfil semelhante não foi observado nos zebuínos. Neste grupo genético, os tratamentos mais elaborados (III e IV) não se mostraram mais eficientes. Estes resultados sugerem que os *Bos indicus* não respondem bem a protocolos com terapia gonadotrófica como a utilizada no TIV. Os animais zebuínos possuem maior número de folículos por onda e por este motivo, o FSH tenha um impacto menor no crescimento dos folículos e consequentemente, menor aumento no desenvolvimento folicular e de oócitos para PIV (BLASCHI *et al.*, 2004). Com isto, nestes animais, protocolos pré- aspiração folicular têm sido considerados para situações de produções insatisfatórias e não para maximizar a produção (SANTOS *et al.*, 2005).

Alvarez *et al.* (2000) demonstraram que vacas zebuínas possuem maiores concentrações plasmáticas de IGF-I e menor concentração de FSH quando comparadas com as taurinas, sugerindo a menor resposta aos tratamentos hormonais.

Embora não tenha sido observada melhoria na qualidade morfológica dos oócitos deste grupo (T IV) em zebuínos, sua capacidade funcional era superior a julgar pela produção de embriões neste grupamento genético. Pois, segundo Viana *et al.* (2010), a eficiência da OPU/PIV está diretamente relacionada à qualidade e consequente potencial de desenvolvimento embrionário dos oócitos recuperados.

Tabela 6: Produção de embriões *in vitro* de doadoras *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* em relação aos diferentes protocolos (média± erro padrão).

T	Animais	Total de embriões (D7)		% Embriões	
		Bti	Btt	Bti	Btt
TI	29	6,2±1,0 ^{A1}	1,0±0,2 ^{B1}	40,5±4,5 ^{A1}	19,5±3,9 ^{B1}
TII	61	4,7±0,6 ^{A12}	2,4±0,4 ^{B12}	29,7±2,9 ^{A1}	29,6±5,0 ^{A1}
TIII	61	4,0±0,6 ^{A2}	2,0±0,4 ^{B12}	34,4±3,6 ^{A1}	23,6±4,3 ^{A1}
TIV	27	5,6±0,0 ^{A12}	2,9±0,6 ^{B2}	54,8±6,0 ^{A2}	24,5±3,7 ^{B1}
Total	178	5,1±0,5	2,0±0,4	39,8±4,2	24,3±4,2

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente por Anava (P< 0,05)

^{1,2} Números diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Anava (P< 0,05). Tratamentos.
Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*.

Com relação à produção de embriões, conforme apresentado na Tabela 6, pode-se observar que, em relação ao total médio de embriões, em todos os tratamentos os zebuínos foram superiores aos animais de origem europeia, demonstrando as divergências quanto ao potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* que ocorrem nas subespécies *taurus* e *indicus* (VIANA *et al.*, 2010).

Carvalho *et al.* (2008) observaram que animais de origem indiana apresentam maior recrutamento de folículos por onda de desenvolvimento folicular, acarretando uma melhor produção embrionária. Possuindo vantagens em relação aos taurinos (BARUSELLI *et al.*, 2007). Gimenes (2010) observou que novilhas *Bos indicus* têm qualidade oocitária superior às *Bos taurus* e bubalinas. Corroborando, Roover *et al.* (2005) citaram que a percentagem de embriões é positivamente correlacionada com o número e qualidade dos oócitos recuperados.

Avaliando a produção de embriões em D7 nos animais taurinos, o único tratamento superior ao controle foi o T IV.

Quando avaliamos o grupamento genético dos zebuínos, observamos que a conversão média de oócitos viáveis em embriões foi maior no tratamento IV. Estes dados estão de acordo com Viana *et al.* (2003), que demonstraram ser o FSH alternativa para incrementar a qualidade oocitária em protocolos para OPU nos zebuínos. Segundo Gibbons *et al.* (1994) o FSH favorece o desenvolvimento embrionário por sincronizar a população folicular, iniciando a maturação *in vivo* dos oócitos por adiantar o desenvolvimento dos folículos, acarretando aumento da competência de desenvolvimento oocitário antes da recuperação dos mesmos.

No grupamento genético dos *Bos indicus*, alguns autores têm sugerido que esta subespécie possuem mais receptores de IGF-I, portanto necessitando de uma menor dose de FSH para a superestimulação no final do protocolo para

aspiração folicular (MONTEIRO *et al.*, 2009). Este maior número de receptores seriam os responsáveis pelo aumento de folículos para a OPU (ALVAREZ , 2000). Estes dados em conjunto explicariam a melhor taxa de recuperação de oócitos em *Bos taurus indicus* e, conseqüentemente, de produção de embriões no recente estudo.

5.3 Efeito da época do ano

Tabela 7: Influência da época do ano nos oócitos viáveis e totais recuperados de animais submetidos a diferentes protocolos de sincronização (média $\pm$ erro padrão).

Época	N	GI	GII*	GIII	Viáveis	Atrésicos	Desnudos	Total
Verão	195	0,7 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	8,7 $\pm$ 0,6	11,7 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	15,2 $\pm$ 0,8
Inverno	149	0,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,6	11,3 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 0,9
Total	344	0,6$\pm$0,1	2,5$\pm$0,1	8,5$\pm$0,4	11,6$\pm$0,5	1,4$\pm$0,1	1,9$\pm$0,1	14,9$\pm$0,6

* Diferença estatística por Anava (P 0,05). G significa Grau; I, II e III corresponde à qualidade dos oócitos. N (número de animais).

De acordo com o estudo *in vitro* de Al-Katanani (2002), o desenvolvimento embrionário é influenciado pela exposição prévia do oócito e embrião ao estresse térmico, e animais doadores aspirados durante o período do verão têm sua capacidade de desenvolvimento até blastocisto reduzido durante a PIV em comparação ao inverno.

Quando se avalia em conjunto as doadoras dos diferentes grupos genéticos não existem diferenças na produção de oócitos nos períodos avaliados (Tabela 7). Este efeito não foi observado provavelmente porque as temperaturas não foram suficientemente altas para causar alterações em animais *Bos taurus*.

De acordo com Camargo *et al.* (2007), oócitos de doadoras Gir no verão foram mais competentes para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e pareciam estar sob menos estresse que oócitos oriundos de doadoras holandesas.

No estudo de NUNES *et al.* (2010), a produção de oócitos viáveis em *Bos taurus taurus* foi similar na época das secas (9,23 $\pm$ 0,86) e das águas (7,59 $\pm$ 0,64; P< 0,05). No entanto, o número de oócitos em *Bos taurus indicus* foi maior e de melhor qualidade em qualquer época do ano (verão/inverno) respectivamente, (14,89 $\pm$ 1,13 e 12,86 $\pm$ 0,19; P<0,05).

Tabela 8: Efeito da época do ano em relação à produção *in vitro* de embriões (média $\pm$ erro padrão).

Época	N	Embriões (D7)	MO	Bi	BL	BX	BE	Conversão (%)*
Verão	195	3,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	20,8 $\pm$ 1,6
Inverno	149	3,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	24,4 $\pm$ 1,8
Total	344	3,2$\pm$0,2	0,1$\pm$0,0	0,9$\pm$0,1	1,1$\pm$0,1	1,1$\pm$0,1	0,0$\pm$0,0	22,4$\pm$1,2

* Conversão (%)= Embriões/ oócitos viáveis.

Quando avaliamos a produção embrionária em épocas do ano distintas, nos dois grupamentos genéticos em conjunto (Tabela 8), não foram observadas diferenças na produção de embriões totais e conversão de oócitos viáveis a embriões. Porém, apenas tendência à melhor conversão de embriões no inverno (24,37 $\pm$ 1,85) em relação ao verão (20,84 $\pm$ 1,57) $P>0,05$.

Os embriões das fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* foram analisados em conjunto, o que pode não ter ocasionado diferença na percentagem dos embriões. Os *Bos indicus* não sofreram interferência da temperatura, levando à não observância de diferença na produção de embriões, concordando com Nunes *et al.* (2010) e Camargo *et al.* (2007). O mesmo não ocorreu no inverno, ou seja, neste período os animais não sofreram com o estresse térmico e, conseqüentemente, tiveram um aumento na taxa de embriões ($P>0,05$).

5.3.1 Época do ano x Grupo Genético

Tabela 9: Recuperação de oócitos viáveis e totais nos diferentes grupamentos genéticos na época do verão e inverno (média $\pm$ erro padrão).

Época	Oócitos viáveis				Total de oócitos			
	N	Btt	N	Bti	N	Btt	N	Bti
Verão	90	8,7 $\pm$ 0,6 ^{A1}	98	15,7 $\pm$ 1,6 ^{B1}	90	12,3 $\pm$ 0,8 ^{A1}	98	19,3 $\pm$ 1,3 ^{B1}
Inverno	86	8,1 $\pm$ 0,7 ^{A1}	80	12,0 $\pm$ 1,0 ^{B2}	86	10,4 $\pm$ 0,9 ^{A1}	80	15,3 $\pm$ 1,2 ^{B2}
Total	176	8,4$\pm$0,6	178	13,8$\pm$1,3	176	11,3$\pm$0,9	178	17,3$\pm$1,2

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha diferem pelo Teste de Duncan ($P=0,05$).^{1,2} Números diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste de Duncan ($P=0,05$). Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*.

Quando avaliados separadamente, podemos observar que, nos diferentes grupamentos genéticos, com relação aos oócitos viáveis e totais, não foram encontradas diferenças entre as épocas do ano nos animais de genética europeia (Tabela 9). Os animais zebuínos produziram mais oócitos viáveis e totais no período do verão. Isso pode ser explicado, pois o regime de manejo destes animais foi o

semiconfinamento e a melhor qualidade das pastagens na época do verão pode ter levado à diferença observada nos zebuínos, além de não ter sofrido com o estresse térmico da época, pois são mais adaptados. Segundo Lucy (2000) e Armstrong *et al.* (2001), existe maior concentração de IGF-I em animais com balanço energético positivo e, como os animais zebuínos possuem mais receptores para IGF-I, estes recuperam maior número de oócitos totais e viáveis.

O mesmo pode ter ocorrido com os taurinos, porém pode não ter se traduzido em melhor produção média de oócitos viáveis e totais nesta categoria genética no verão, pois este grupamento sofre com o estresse térmico, pois são menos adaptados, e o efeito deletério da temperatura nestas doadoras no período mais quente é mais severo.

Tabela 10: Produção média de embriões *in vitro* nos diferentes grupamentos genéticos na época do verão e inverno (média $\pm$ erro padrão).

Época	Total de embriões (D7)				% Embriões			
	N	Btt	N	Bti	N	Btt	N	Bti
Verão	90	1,9 $\pm$ 0,3 ^{A1}	98	5,1 $\pm$ 0,5 ^{B1}	90	19,5 $\pm$ 2,6 ^{A1}	98	33,1 $\pm$ 2,4 ^{B1}
Inverno	86	2,2 $\pm$ 0,3 ^{A1}	80	4,5 $\pm$ 0,5 ^{B1}	86	28,5 $\pm$ 3,2 ^{A2}	80	41,5 $\pm$ 3,5 ^{B2}
Total	176	2,0$\pm$0,3	178	4,8$\pm$0,5	176	24,0$\pm$2,9	178	37,3$\pm$2,9

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha diferem pelo Teste de Duncan (P 0,05).

^{1,2} Números diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste de Duncan (P 0,05). Btt- *Bos taurus taurus*; Bti- *Bos taurus indicus*.

Quando julgamos a produção média embrionária nos grupamentos genéticos e épocas distintas, notamos possível efeito deletério do verão nos oócitos das doadoras europeias (Tabela 10). A maior produção no inverno mostra que embora não tenha havido diferença no total ou qualidade dos oócitos, a capacidade intrínseca do desenvolvimento de embriões foi afetada pelos fatores climáticos tanto nas doadoras taurinas como nas zebuínas. A subespécie *Bos taurus indicus*, em ambientes tropicais, possui melhor desenvolvimento embrionário, como também demonstrado por Camargo *et al.* (2007).

6 CONCLUSÃO

Em um mesmo tratamento e época do ano, doadoras *Bos indicus*, produzem em média mais oócitos viáveis, totais e embriões por aspiração e têm melhor taxa de conversão de oócitos/ embriões que doadoras *Bos taurus*.

Os animais zebuínos produziram maior número de oócitos viáveis e totais no verão. No período do inverno a conversão de oócitos viáveis a blastocistos foi superior nos dois grupamentos genéticos.

O protocolo completo, com FSH, aumenta a recuperação de oócitos viáveis e totais apenas em taurinos. Em zebuínos o protocolo com FSH aumenta a qualidade dos oócitos.

Avaliando os grupamentos genéticos em conjunto, não houve diferença da época verão/ inverno em relação à recuperação de oócitos viáveis, totais, total de blastocistos e conversão de oócitos em blastocistos em D7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P. et al. Associations between surges of follicle-stimulating hormone and emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.

AHMAD, N. et al. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 1, p. 13-28, 1997.

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competente in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 396, 2002.

ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1291-1302, 2000.

ANTONIOLO, C.B. Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação. In: SEMINÁRIO DE ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO, Rio Grande do Sul. Anais... Rio Grande do Sul: Pós Graduação em Ciências Veterinária da UFRGS, 2002. Rio Grande do Sul, 2002. p. 1-15.

ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte orage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.

ARMSTRONG, D.G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology Reproduction**, v.64, p. 1624- 1632, 2001.

BACELAR, D. et al. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 1, p. 163-172, jan./mar., 2010.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483–1496, 2001.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U., SALES, J. N. de S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-7, 2006.

BLASCHI, W. et al. Utilização prévia de Pluset na aspiração folicular: impacto na produção in vitro de embriões em vacas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.186, 2004. (Abstract).

BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38–43, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUIBALT, L. A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 1191-1203, 1996.

BÓ, G. A. et al. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes ésteres de estradiol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Ed. UEL, 2006. p. 71-84.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Dinámica Folicular Ovariana en el Bovino. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Departamento de reprodução animal: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2000. p. 12 –34.

BÓ, G. A. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G. A. et al. Effect of progestogen plus E- 17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996.

BÓ, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 α treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A. et al. Taxas de recuperação e morfologia em oócitos bovinos obtidos por aspiração folicular após diferentes tratamentos hormonais em bovinos. **Acta Science Veterinariae**, 2010 (Resumo).

BÓ, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BOLS, P. E. J. et al. Effects of aspiration vacuum and noodle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-14, 1996.

BOLS, P. R. J. et al. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-87, 1995.

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, n.2, p.277-289, 1997.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

BRACKETT, B. C. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 101, p. 147-158, 1982.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D. 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. 667-676, 1995.

CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef heifers with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 1, p. 341, 1998.

CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Vet e Zootec.**, v.17, n.1, p.8-18, marc.2010.

CAMARGO , L. S. A. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, 2007.

CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone –based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

COOPER, M. J. Control of oestrus cycle of heifers with a synthetic prostaglandin analogue. **Veterinary Record**, v. 95, p. 200-203, 1974.

COSTA, E. P. et al. Tipos morfológicos de oócitos bovinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 4, p. 417-424, 1997.

COTICCHIO, G. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? Annals of the New York. **Academy of Sciences**, v. 1034, p. 132/ 44, 2004.

DAYAN, A. et al. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção in vitro de embriões em raças zebuínas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 226, 1999. (Resumo)

DE WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1277- 1283, 2000.

DODE, M. A. N. Avanços na maturação oocitária em bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 34, p. 115-130, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1813- 1821, 2004.

DOMINGUEZ, M. M. Effect of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 1405-1418, 1995.

FABER, D. C. et al. Commercialization of animal biotechnology, **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.

FERNANDES, C. A. C. **Apostila de Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal**. Alfenas- MG, 2000.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

GALLI, C. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C.; LAZAZARI, G. Practical aspects of lvm/lvf in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.

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.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.;. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. **Anais...** São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2004, p. 223- 230.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1066-73, 1997.

GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L. *et al.* Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, p. 405-419, 1994.

GIMENES, L.U. **Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular**. 2010. 122 fls.Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GOODHAND, K. L.; STAINS, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine treated with progesterone, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 145-158, 2000.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E. In vivo recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004.

HANZEN, C.; GOFFIN, L. Use of ultrasonography for ovum pick-up (OPU) in the bovine. A review. **Ann. Med. Vet.**, v. 142, p. 81-91, 1998.

HASLER, J. F. Commercial production of in vitro-derived bovine embryos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 24, p. 117-134, 1996.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 909-920, 2004.

HENDRIKSEN, P. J. et al. Bovine follicular development and as effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HORNE, R.; BISHOP, C. J.; REEVES, G. Aspiration of oocytes for *in vitro* fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 77-85, 1996.

KAJIHARA, Y.; BLAKEWOOD, E. G.; MYERS, M. W. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 220, 1991.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes, wal map 150 cm x 200 cm, 1928.

KRUIP, T. A. M. et al. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

LEIVAS, F.G. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.219-224, 2004.

LONERGAN, P. et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 259-267, 2003.

LONERGAN, P.; D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 41, p. 427-437, 2001.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48–53, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1635-1647, 2000.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, p. 543-550, 2000.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 1–11, 1992.

MEINTJES, M. et al. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cows for in vitro fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 967- 974, 1995.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MIHM, M.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. H. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection , of the dominant follicle in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1328-1337, 1997.

MIYAUCHI, T.; FERNANDES, C. A. C.; OLIVEIRA, E. R.; ALVES, B. F. L. A.; E VIANA, J. H. M. Effect of follicular wave synchronization and absence of corpus luteum on COC recovery in Gyr (*Bos Taurus indicus*) cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 300, 2009 (Resumo).

MIYAUCHI, T. M. M.; FERNANDES, C. A. C.; OLIVEIRA, E. R.; ALVES, B. F. L. A.; PALUDO, F.; FIGUEIREDO, A. C. S.; GIOSO, M. M.; MIYAUCHI, T. Efeito da sincronização folicular e da estimulação com FSH sobre os resultados da aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2010 (Resumo).

MOMOZAWA, K.; FUKUDA, Y. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes with heterogeneous ooplasm. **Anim. Sci. Tech.**, v. 66, p. 605–9, 1995.

MONTEIRO, F. M. et al. Influence of Superovulatory Protocols on In Vitro Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 860–864, 2009.

MORENO, J. F. et al. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 271, 1993.

MORENO, J. F. et al. Influence of parity of donor and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-mortem. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 1, p. 65, 1992 (abst).

NONATO JÚNIOR, I. et al. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 95, 2004.

NONATO JR, I. **Produção de embriões em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) com a associação dos métodos *in vivo* e *in vitro***. 2005. 50 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

NUNES, D. S. R. et al. Fatores que interferem na qualidade oocitária e no número de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, 2010 (Resumo).

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992.

PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T. **Theriogenology**, v. 60, p. 175-188, 2003.

PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 687- 697, 2003.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-762, 1988.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665- 675, 1935.

PONTES, J. H. F. **Aspectos aplicados da produção *in vitro* de embriões *Bos indicus***. 2009. n.º 160 fls. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

PONTES, J. H. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690- 697, 2009.

PFEIFER, L. F. et al. Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção *in vitro* de embriões. Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Tecnologia De Embriões, 19, 2005, Angra dos Reis, RJ. Porto Alegre: UFRGS, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, Supl. 1, p. 184, 2005.

PFEIFER, L. F. M. et al. **Influência de diferentes níveis de progesterona na foliculogênese de vacas de corte submetidas a punção folicular.** In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 13 E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO 6, 2004, Pelotas. **Anais...**Pelotas, 2004.

RAMOS, A. A. et al. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, jun, 2006.

RAO, C. et al. Receptors for gonadotrophin and prostaglandin F2 α in bovine corporea lutea of early, mid and late luteal phase. **Acta Endocrinol.**, v. 91, p. 529-534, 1979.

RHODES, F. M.; DE´ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 265-277, 1995.

RIBEIRO JÚNIOR, I. **Análises estatísticas no SAEG.** Viçosa-MG: Editora UFV, 2001. 301p

RIBEIRO, L. V. P. **Aspiração de oócitos e produção de embriões in vitro de vacas estimuladas com hormônio folículo estimulante (FSH) ou gonadotrofina coriônica eqüina (eCG).** 2009, 33 fls.Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá-PR, Maringá-PR, 2009.

RICHARDS, J. S.; MIDGLEY Jr., A. R. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 82-94, 1976.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 44-50, 2008.

ROOVER, R. et al. 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, 2005.

RODRIGUES, C. F.; GARCIA, J. M. Fecundação in vitro: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 186-187, 2000.

RUBIN, K. C. P. et al. **Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18, Barra Bonita. *Resumos...* Porto Alegre: UFRGS, 2004. v. 32. p. 121, 2004.

RUBIN, K. C. P. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção in vitro de embriões (PIVE).** 2006. n ° 46 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, 2006.

RUBIN, K. C. P. et al. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 183, 2005.

SÁ FILHO, O. G. **Efeitos de tratamentos com progesterona e/ou estradiol na incidência de regressão prematura do corpo lúteo após a primeira ovulação em vacas Nelore pós-parto.** 120f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2006.

SANTOS, R.G. et al. 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.

SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.

SENDAG, S. et al. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up I Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 208-214, 2008.

SENEDA, M. M. et al. **Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro***. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, Londrina. *Anais...* Londrina: Ed. da UEL, 2006. p. 172-180.

SENEDA, M. M. et al. Aspiração folicular transvaginal sem estímulo hormonal em vacas holandesas. **ARS veterinária**, v. 17, n. 1, p. 11-16, 2001.

SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SHIOYA, Y. et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 30, p. 489– 496, 1988.

SIQUEIRA, L. G. et al. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 949-58, 2009.

SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M. 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. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.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.

SOUSA, A. J. O. **Avaliação da técnica de aspiração ovocitária transvaginal (Ovum Pick Up) e produção in vitro de embriões da raça nelore (Bos taurus indicus) oriundos de doadoras com alterações da fertilidade**. 2007. n ° 70 fls. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001.

STROUD, B. K.; MYERS, M. W. Clinical results in a comercial IVF facility **Ars Veterinária**, v. 9, p. 105-230, 1993.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VAN DE VELDE, A. Developmental competence of juvenile cows oocytes *in vitro* and *in vivo*: Influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.

TOWNSON, D. H. et al. *Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows*. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1053-1058, 2002.

TSAFRIRI, A.; BRAW, R. H. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf. Rev. Reproductive Biology*, v. 6, p. 226-265, 1984.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 914- 925, 2006.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, 2005.

VIANA, J. H. M. et al. Embrapa Gado de Leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 68, 2003.

VIANA, J. H. M. et al. 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, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M. Mudanças e Tendências no Mercado de Embriões Bovinos no Brasil. **Jornal O Embrião**, v. 10, n. 42, p. 5- 7, jul/ ago. 2009.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H. M. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 661-s674, 2010. (Suplemento 2)

VIANA, J. H. M. et al. Associação entre as técnicas de punção folicular e colheita de embriões em vacas Gir. **Arquivos da faculdade de Veterinária UFGRS**, v. 32, n. 1, p. 193, 2004 (Resumo).

WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V. Aspecto comercial de embriões produzidos in vitro. GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F., In: **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. P. 293- 302.

WIT, A. A. C. et al. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus*-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1277- 1283, 2000.

WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

XU, K. P. et al. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, p. 505– 519, 1986.

YANG, Y. B.; LU, K. H. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v. 33, p. 355, 1990.