

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA PROGESTERONA EXÓGENA NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES EM NOVILHAS NELORE PRÉ-
PÚBERES**

Rafael Rodrigues Corrêa

Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA PROGESTERONA EXÓGENA NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES EM NOVILHAS NELORE PRÉ-
PÚBERES**

Rafael Rodrigues Corrêa

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia
Coorientadora: Profa. Dra. Naiara Saraiva Zoccal**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias–Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

2015

Correa, Rafael Rodrigues
C824e Efeitos da progesterona exógena na produção *in vitro* de
embriões em novilhas Nelore pré-púberes / Rafael Rodrigues Correa.
-- Jaboticabal, 2015
xvii, 63 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Coorientador: Naiara Saraiva Zoccal
Banca examinadora: Fábio Morato Monteiro, Gilson Hélio
Toniollo, Maria Emilia Franco Oliveira, José Octavio Jacomini
Bibliografia

1. Bovinos. 2. Oócitos. 3. Corpo lúteo. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
-- Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DA PROFESTERONA EXÓGENA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PUBERES

AUTOR: RAFAEL RODRIGUES CORREA

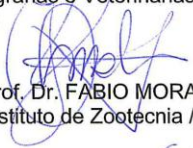
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NAIARA ZOCCAL SARAIVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. FABIO MORATO MONTEIRO
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP


Prof. Dr. JOSÉ OCTAVIO JACOMINI
Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 08 de julho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL RODRIGUES CORRÊA – Nascido em Jaboticabal-SP na data de 03/03/1980. Formou-se em medicina veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 07 de março de 2007. Nessa mesma unidade iniciou-se nas atividades acadêmicas com projetos de iniciação científica: Agência Financiadora CNPQ. Trabalhou com assessoria técnica em reprodução animal com bovinos de leite e corte a campo nos anos de 2007 até 2009. Neste ano ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária, área (Patologia Animal) pela UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, finalizando em 27/06/2011, com a dissertação intitulada: Eficácia ectoparasitícida de uma nova associação (cipermetrina 15% + clorpirifós 30% e fenthion 15%) via tópica (pulverização), em bovinos natural e experimentalmente infestados. Desde 01/08/2011 está no doutorado do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal da UNESP- Jaboticabal, finalizando no dia 08/07/2015, com a tese intitulada: Efeito da progesterona na piv em novilhas nelore pré-púberes.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

José de Alencar

DEDICO

Dedico este trabalho a Deus, por uma força maior que sempre me guiou.

A minha mulher Taciana minha grande companheira, por ajudar nos bons e maus momentos. Só você sabe o que já passamos juntos. “Linda te amo”

A Helena, minha filha, a essência de amor, incondicional e eterno, obrigado Deus por ter a oportunidade de ser “Pai da HELENA” você é sensacional!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
filha TE AMOOOO.

Aos meus pais José Américo e Elizabeth por serem os mentores de tudo que eu sou, obrigado. Vocês sempre me ajudaram muito e ajudam ainda, serei eternamente grato.

Aos meus irmãos pelo apoio.

A todos os meus familiares...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, por ser acima de tudo um grande mentor e sinônimo de sabedoria, em que sempre irei me espelhar.

A minha coorientadora Naiara Zoccal Saraiva, pelo exemplo de dedicação, perseverança e chegou lá hein, parabéns. Tenho muito a aprender com você.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, Devanir e Marcos do laboratório de Endocrinologia, por realizar as análises de progesterona.

Aos demais professores e pesquisadores que participaram do desenvolvimento deste trabalho: Aos professores integrantes da banca de qualificação e defesa.

Em especial aos grandes amigos Aderson, Anelise e Guilherme. Estes sim mostraram a essência da amizade: “Amizade verdadeira é aquela que ambas as partes preocupam-se e zelam pela outra pessoa, independente da situação, do momento”. Diante disso não tenho nada a falar, só agradecer.

A uma pessoa que não precisava não me conhecia, mas mostrou toda a sua essência e caráter: Ricardo Perecin Nociti “Cara meu muito obrigado” suas análises me ajudaram muito.

Aos demais integrantes do Laboratório de Reprodução Animal da UNESP-Jaboticabal, em especial “RÔ” que da Europa veio direto para Guataporã (que evolução hein!!!!) e PAIEIRO pelas boas conversas e risadas (Um dia vou pagar o café) e Ivo “ O fazendeiro de Tocantins”.

Aos residentes que ajudaram nos dias intermináveis de experimento. Pois, o senhor Aderson não sabe dirigir e os residentes eram os motoristas que transportavam os oócitos do curral para o laboratório.

Aos estagiários que nos acompanhavam nos dias de trabalho intenso.

A Ourofino por ceder os animais, e os fármacos para realizar o trabalho. Obrigado José Ricardo, Evandro, Michele e Alessandra, equipe de reprodução.

Aos peões da fazenda da Ourofino, sem estes acho que seria impossível: “Degas”, Rodolfo, “Dudu” vocês com certeza tem o meu respeito e a todos da fazenda “ Ineis”, Tanaka, Dinei, Cléber, Paidegua, Júlio.

Ao Ricardo Antônio Homem “Campeiro”. Só a gente sabe o que passamos na lida.

Aos Veterinários Ingo e Vanessa, pessoas com grandes responsabilidades e humanas, acima de tudo. Um ajudou cedendo os animais e outro as instalações, enfim foram fundamentais também.

A Yeda Watanabe, por emprestar o ultrassom e outros equipamentos para a realização das aspirações. Essa sabe tudo!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Puberdade.....	2
2.1.1 Fatores relacionados com a puberdade	4
2.2 PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	7
2.2.1 PIVE x idade da doadora.....	11
2.3 PROGESTERONA (P4)	12
2.3.1 Progesterona x reprodução	14
2.3.2 Progesterona longa ação	15
3. OBJETIVO	18
4. HIPÓTESE EXPERIMENTAL	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 Comitê de ética	18
5.2 Local e período.....	18
5.3 Animais doadores de oócitos, tratamento e delineamento experimental	19
5.4 Aspiração folicular e produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	23
5.4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	24
5.4.2 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos (MIV)	24
5.4.3 Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos (FIV)	24
5.4.4 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV)	25
5.5 Avaliações ultrassonográficas e colheita de sangue para dosagem de progesterona	26
5.6 Dosagem de Progesterona Sérica	27
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27

7. RESULTADOS.....	28
7.1 Dosagem de Progesterona Sérica	28
7.2 Novilhas pré-púberes (sem CL).....	29
7.3 Novilhas que apresentaram CL x novilhas sem CL.....	31
8. DISCUSSÃO	35
8.1 Concentrações séricas de progesterona	37
8.2 Influência da progesterona na quantidade e qualidade oocitária	39
8.3 Influência da progesterona na qualidade e produção embrionária	40
9. CONCLUSÃO	44
10. REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES	62



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 022455/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"A aplicação da progesterona injetável exógena interfere na recuperação e qualidade oocitária e na produção de embriões *in vitro* em novilhas pré-púberes Nelore"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de dezembro de 2014.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

EFEITOS DA PROGESTERONA EXÓGENA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

RESUMO - A progesterona e seus análogos têm sido utilizados para diversas finalidades na reprodução animal. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da progesterona injetável no número de oócitos recuperados, na qualidade oocitária e produção embrionária de novilhas Nelore pré-púberes. Foram utilizadas 31 fêmeas com idade entre 18 a 20 meses, não gestantes e não cíclicas. As doadoras de oócitos foram divididas em 3 grupos experimentais em delineamento **crossover** da seguinte maneira: Grupo P0 (n=11), os animais deste grupo receberam duas aplicações de solução placebo (1 mL), com intervalo de 7 dias iniciando 14 dias (D-14) antes da primeira aspiração (D-0); Grupo P7 (n=10): os animais receberam uma aplicação de solução placebo (1 mL) 14 dias (D-14) e uma de progesterona (P4) injetável (150mg) 7 dias (D-7) antes da aspiração; Grupo P14 (n=10), neste grupo os animais receberam duas aplicações de P4 injetável (150mg) com intervalo de 7 dias, a primeira 14 dias (D-14) e a segunda 7 (D-7) dias antes da aspiração. Realizaram-se um total de três aspirações foliculares em intervalos de 28 dias. Os animais que apresentaram CL durante o experimento foram alocados em um grupo separado para serem analisados e comparados com o grupo sem CL. Os oócitos recuperados foram selecionados e submetidos aos procedimentos da PIVE. Após a confirmação da homocedasticidade (BoxCox) e normalidade (teste de Cramér-von Mises) dos dados, realizou-se a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para as comparações das médias das variáveis, para as correlações dos dados foi utilizado o teste de correlação de Pearson, e significantes quando $p \leq 0,05$. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao número de oócitos recuperados (oócitos totais), oócitos viáveis (G I, II, III), entre os animais tratados (grupos P7 e P14) em relação aos animais que não receberam P4 (grupo P0). As doadoras apresentaram média de $14,98 \pm 10,82$ oócitos coletados por sessão de aspiração. As médias e desvio padrão das taxas (%) de oócitos viáveis e de embriões produzidos não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos. Os grupos P0, P7, P14 obtiveram taxa de 76%, 80% e 68% de oócitos viáveis, e taxas de embriões produzidos de 36%, 42% e 43% respectivamente. Os grupos P0, P7 e P14 obtiveram uma média de 4,04, 5,03 e 4,43 embriões produzidos por sessão de aspiração. As novilhas que foram confirmadas com presença de CL foram analisadas quanto às mesmas variáveis do grupo de novilhas pré-púberes (sem CL). Ao comparar entre os grupos as variáveis oocitárias (oócitos viáveis, atrésicos, desnudos e oócitos totais), foi verificado que os animais do grupo sem corpo lúteo apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao número de estruturas recuperadas ($16,07 \pm 11,03$ versus $11,16 \pm 9,75$). Verificou-se que os animais com CL produziram menor quantidade de oócitos viáveis ($8,16 \pm 8,94$) e totais ($11,16 \pm 9,75$) ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo sem CL ($12,30 \pm 8,64$) e ($16,07 \pm 11,03$). A média de embriões produzidos foi de $4,16 \pm 5,16$ para o grupo com CL e $4,74 \pm 4,86$ para o grupo sem CL por sessão de aspiração. A utilização do tratamento com progesterona não melhorou as variáveis oocitárias e embrionárias analisadas.

Palavras-chave: bovinos, oócitos, corpo lúteo, puberdade

EFFECTS OF EXOGENOUS PROGESTERONE *IN VITRO* EMBRYOS PRODUCTION IN PREPUBERTAL NELORE HEIFERS

ABSTRACT - Progesterone has been used for various purposes in the animal reproduction. The objective of this study was to evaluate the influence of exogenous progesterone injection in the number of recovered oocyte, oocyte quality and embryo production of prepubertal Nelore heifers. We used 31 females (18 to 20 months) non pregnant and without corpus luteum (CL). Cows were divided in 3 groups in a cross-over design: Group I P0 (n=11), animals received two placebo solution applications (1 mL), 7-day interval and starting 14 days (D-14) before the first aspiration (D-0); Group II P7 (n=10) treated group, the animals received a placebo solution application (1 mL) 14 days (D-14) and injecting progesterone (P4; 150 mg) 7 days (D-7) before aspiration; Group III P14 (n = 10), animals received two injections of P4 (150µg) with an interval of 7 days, the first 14 days (D-14) and the second 7 days (D-7) before aspiration. We conducted 3 aspiration with 28-day intervals. The animals with CL during the experiment were placed in a separate group to be analyzed and compared with the group without CL. The recovered oocytes were selected and submitted to the procedures of the *in vitro* embryo production (IVEP). After confirming the homocedasticity (BoxCox) and normality (Cramér-von Mises test) of the data, carried out the analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was used to compare the means of the variables and the pearson correlation test was used for correlations of the data, considered significant when $p \leq 0.05$. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the number of oocytes retrieved (total oocytes), viable oocytes (GI, II, III), between the animals treated (P7 and P14 groups) and animals that did not receive P4 (P0 group). The animals showed an average of 14.98 ± 10.82 oocytes collected by aspiration session. The mean and standard deviation of rates (%) of viable oocytes and embryos produced did not differ ($p > 0.05$) between groups. The groups P0, P7, P14 had a rate of viable oocytes 76%, 80% and 68% and rate of embryos produced 36%, 42% and 43%, respectively. The groups P0, P7 and P14 had an average of 4.04, 5.03 and 4.43 embryos produced by aspiration, respectively. Heifers were confirmed with the presence of CL were analyzed for the same variables of the group of prepubertal heifers (no CL). When comparing between treatments the variables of oocytes (total oocytes, viable, atresia and desnuded) it was found that the animals without CL showed significant differences ($p < 0.05$) in the number of recovered structures ($16.07 \pm 11,03$ vs. 11.16 ± 9.75). It has been found that animals with CL produced a lower quantity of viable oocytes ($8,16 \pm 8,94$) and total ($11,16 \pm 9,75$) ($p < 0.05$) compared to the group without CL ($12,30 \pm 8,64$) and ($16,07 \pm 11,03$). The average embryos produced was $4,16 \pm 5,16$ for the group with CL and $4,74 \pm 4,86$ for the group without CL for aspiration. The use of progesterone therapy did not improve oocyte and embryonic variables.

Keywords: bovine, oocytes, corpus luteum, puberty

LISTA DE ABREVIATURAS

A= Atrésico
CL= Corpo lúteo
CS= Coleta de Sangue
CV= Coeficiente de Variação
CIV= Cultivo in vitro
CYP11A1= P450 de clivagem de colesterol em cadeia
D= Desnudo
D= Dia
E2= Estrógeno
ER α = Receptores de estrógeno alfa
ER β = Receptores de estrógeno beta
ECC= Condição de Escore Corporal
EP= Embriões produzidos
FIV= Fecundação in vitro
FSH= Hormônio folículo estimulante
GI= Grau I
GII= Grau II
GIII= Grau III
GP= Ganho de peso
G= Gaus
GABA= Ácido gama aminobutírico
GnRH= Hormônio Liberador de Gonadotrofina
hCG= Gonadotrofina Coriônica Humana
HSD3B= 3B-hidroxiesteroide desidrogenase
I¹²⁵= Iodo radioativo 125
IA= Inseminação Artificial
Km= Quilômetro
Kg= Quilograma
LH= Hormônio Luteinizante

MAPA= Ministério da Agricultura e Abastecimento

MAP= acetato de medroxiprogesterona

MIV= Maturação *in vitro*

ml= mililitros

mmHg= milímetro de mercúrio

MOTE= Múltiplas ovulações por transferências de embriões

µg= Micrograma

ng= Nanograma

OPU= Ovum Pick-up

OT= oócitos totais

OV= oócitos viáveis

PBS= Solução salina fosfatada

PIB= Produto Interno Bruto

PGF2α= Prostaglandina F2-alfa

P0= Grupo controle

P7= Grupo tratado com uma aplicação de 150 mg de progesterona sete dias antes da aspiração

P14= Grupo tratado com duas aplicações de 150 mg de progesterona, a primeira quatorze dias antes da aspiração e a segunda sete dias

P4= Progesterona

PIVE= Produção *in vitro* de embriões

RU486= mifepristona

TXP= Taxa de produção

StAR= proteína reguladora aguda esteroidogênica

USDA= Departamento de Agricultura Americano

US= Ultrassom

UI= Unidade internacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número dos bovinos, constituição dos grupos, pesos, número de folículos e dose medicamentosa de novilhas nelore pré-púberes.

Tabela 2. Médias ajustadas ($\pm$ desvio padrão) dos grupos (P0, P7 e P14), quanto a concentração sérica de progesterona em ng/mL de novilhas Nelore pré-púberes (S/CL) e púberes (C/CL), Guatapar, SP, 2014.

Tabela 3. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), dos grupos (P0, P7 e P14), oócitos de grau 1 (GI), oócitos de grau 2 (GII), oócitos de grau 3 (GIII), de novilhas Nelore pr-púberes, Guatapar, SP, 2014.

Tabela 4. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), dos grupos (P0, P7 e P14), quanto a taxa de oócitos viáveis e embriões produzidos de novilhas Nelores pr-púberes, Guatapar, SP, 2014.

Tabela 5. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão) da comparação das variáveis oocitárias dos grupos com CL (púberes) e sem CL (pr-púberes) de novilhas Nelore, Guatapar, SP, 2014.

Tabela 6. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), da comparação das variáveis oocitárias (taxa de oócitos viáveis) e embrionária (taxa de embriões produzidos dos grupos com CL (púberes) e sem CL (pr-púberes), de novilhas Nelore, Guatapar, SP, 2014.

Tabela 7. Valor de R da correlação Pearson para oócitos viáveis (OV), oócitos totais (OT), embriões produzidos (EP), taxa de produção de embrião (TXP), oócitos grau 1 (GI), oócitos grau 2 (GII), oócitos grau 3 (GIII), atrésicos (A), desnudos (D), peso corporal (PESO) e ganho de peso (GP) de novilhas Nelore pr-púberes, Guatapar, SP, 2014.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil plasmático de vacas Nelore não lactante, tratadas com progesterona injetável longa ação, administrada 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.

Figura 2. Grupo P0 (n=31): Os animais receberam duas aplicações de solução oleosa placebo (1 mL), com intervalo de 7 dias iniciando 14 dias (D 14) antes da primeira aspiração (D 0).

Figura 3. Grupo P7 (n=31): Os animais receberam uma aplicação de solução oleosa placebo (1 mL) 14 dias (D14) antes e uma de progesterona injetável (150 mg) 7 dias (D7) antes da aspiração.

Figura 4. Grupo P14 (n=31): Os animais receberam duas aplicações de P4 injetável (150 mg) com intervalo de 7 dias, a primeira 14 dias (D14) e a segunda 7 (D7) dias antes da aspiração.

Figura 5. Representação esquemática das coletas sanguíneas para dosagem de progesterona, avaliações ultrassonográficas e aspiração folicular em novilhas da raça Nelore. US, Ultrassonografia; D, dias; CS, coleta de sangue- para determinação da concentração sérica de progesterona.

1. INTRODUÇÃO

A agropecuária tem importante papel na configuração geopolítica do território nacional, e seu processo de desenvolvimento mostra a sua importância social para a geração de empregos e renda (BEZERRA; ELIAS, 2011). Nas últimas décadas o Brasil apresentou um forte crescimento do PIB (Produto Interno Bruto), e em 2012 conquistou a sétima posição dentre os maiores PIB(s) do mundo, com US\$ 2,3 trilhões. Estes indicadores sugerem que os setores da agricultura, pecuária e agronegócio em geral são de grande importância para a geração do crescimento econômico brasileiro (FIGUEIREDO et al., 2012).

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio no cenário mundial. O Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, das quais aproximadamente 80% são compostos por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), de comprovada rusticidade e adaptação ao ambiente predominante no país (ABIEC, 2014). Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente, atuando em mais de 180 países (MAPA, 2014). Em 2013 o país liderou o ranking mundial em dois quesitos, como maior produtor e maior exportador apresentando valores na ordem de 9,7 e de 1,85 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2013).

Apesar dos números significativos e de sua importância econômica, a pecuária de corte compete cada vez mais por espaço físico-econômico com culturas agrícolas de alto potencial produtivo (ROCHA et al., 2011). Esta competitividade gera mudanças, como o processo de incorporação de tecnologias, por parcela significativa dos pecuaristas movidos pela necessidade de obter maior eficiência produtiva (IEL, CNA, SEBRAE, 2000).

Do ponto de vista econômico, a reprodução é um dos principais focos da pecuária. Assim, a utilização de biotecnologias reprodutivas é uma alternativa para aumentar os índices zootécnicos de um rebanho bovino (RUBIN, 2006). O desenvolvimento e a aplicação dessas biotécnicas são condições indispensáveis para a melhoria na eficiência. Técnicas como Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE), vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras, mais

recentes, como a produção *in vitro* de embriões, têm contribuído para acelerar o melhoramento genético, ao utilizar animais provados e com características desejáveis e superiores (SANTOS, 2010).

O sucesso na produção de bovinos de corte é muito dependente da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS e WALTON, 2000), por isso, elas devem receber atenção e avaliação privilegiada, para que possamos selecionar animais adaptados ao ambiente de criação, resultando em ganhos de desempenho e redução de custos.

Na pecuária brasileira ocorre um grande desperdício quanto à utilização precoce das fêmeas na reprodução, uma vez que as novilhas são recriadas durante a estação seca em sistema de sobrevivência. Com isto, um alto percentual delas vai para o abate sem nenhuma chance de identificar as de maior precocidade sexual (LANNA, 2004).

Os hormônios reprodutivos influenciam diretamente a qualidade dos oócitos e embriões. Assim avaliar a influência da progesterona injetável longa ação na taxa de recuperação e qualidade oocitária e produção de embriões de novilhas Nelore pré-púberes, pode-se tornar uma ferramenta auxiliar nos programas de produção *in vitro* de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Puberdade

A idade a puberdade, condição reprodutiva, raça e composição genética são características importantes que irão influenciar a produtividade e o aumento da vida reprodutiva do animal (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Pesquisadores têm despertado grande interesse de trabalhar com fêmeas pré-púberes em programas de melhoramento animal, por aumentar o ganho genético e proporcionar maior aproveitamento dos inúmeros oócitos disponíveis nestes animais (SNEL OLIVEIRA et al., 2003).

A puberdade é um processo gradual de maturação que se inicia antes do nascimento e continua ao longo do período pré e peripuberal (McDONALD, 2003). O conceito de “puberdade” na fêmea, segundo diversos autores, é a idade em que se manifesta o primeiro estro acompanhado de ovulação e início da ciclicidade reprodutiva (WILTBANK et al., 1969; NOGUEIRA, 2004), caracterizada por uma fase luteal com duração normal (ATKINS et al., 2013).

Mecanismos endócrinos pós-natal garantem que a bezerra não ative o sistema reprodutivo até que possua desenvolvimento somático compatível com a reprodução, próximo de 65-70% do peso adulto e que sinalize que o gasto de energia com o crescimento e desenvolvimento está diminuindo, permitindo parte do gasto com gestação, parto e lactação (SEMMELMANN et al., 2001).

De acordo com Day et al. (1998), em animais da raça Holandesa a puberdade pode ser dividida em quatro fases, começando com um período infantil (nascimento até 2 meses de idade), período de desenvolvimento (2 a 6 meses de idade), uma fase estática (6 a 10 meses de idade) e período de peripuberdade que se inicia, aproximadamente, nos 50 dias que antecedem a puberdade. Nogueira (2004) ao estudar a puberdade em novilhas zebuínas mostrou que as mudanças na secreção das gonadotrofinas são similares ao reportados em rebanhos *Bos taurus* e a sua ocorrência é o resultado de uma série de eventos complexos que regulam o eixo reprodutivo endócrino (SCHILLO et al., 1992).

Sob o ponto de vista fisiológico, a puberdade caracteriza-se por um aumento da liberação de GnRH pelo hipotálamo, resultando no aumento da concentração e frequência pulsátil de LH e um decréscimo na sensibilidade do hipotálamo aos esteróides gonadais, o que resultará na primeira ovulação (DAY et al., 1984).

No processo de controle da secreção de LH, o estrógeno (E2) tem sido visto como o principal hormônio regulador do início da puberdade, ao exercer um feedback negativo no hipotálamo, inibindo a liberação do GnRH em períodos que antecedem a puberdade, sendo que, próximo à ocorrência da mesma, há uma reversão do feedback negativo para positivo, permitindo que aconteça o aumento na frequência dos pulsos do LH, necessário à maturação final e ovulação do folículo dominante (hipótese “gonadostática”) (OJEDA et al., 1982; KINDER et al., 1987; RODRIGUES et al., 2002).

Durante o período de maturação sexual em novilhas observa-se a ocorrência da diminuição na concentração de receptores citoplasmáticos de estrógenos (RE) na porção anterior do hipotálamo, no hipotálamo médiobasal e na hipófise anterior. O declínio no número de receptores coincide com o declínio do feedback negativo do estradiol, ocorrendo um aumento na secreção de LH. Existem dois subtipos de receptores para estradiol ($RE\alpha$ e $RE\beta$) e aparentemente o $RE\alpha$ é mais importante para estimular a secreção de gonadotrofinas que o $RE\beta$ (EMERICK et al., 2009).

Outra possível explicação para o início da maturação sexual seria o aumento da sensibilidade dos gonadotrofos da hipófise frente ao estímulo do GnRH como resultado do aumento do número de receptores de GnRH induzido pelo estradiol (RODRIGUES et al., 2002). Entretanto, acredita-se que o componente final que regula o início da puberdade em novilhas e ovelhas é o hipotálamo, uma vez que o número de receptores da hipófise para o GnRH não aumentou durante o período de maturação sexual (DAY et al., 1987).

A segunda hipótese considerada para explicar a contenção da atividade gonadal é a central ou neural, que envolve a participação de neurotransmissores com capacidade de inibir a secreção de gonadotrofinas, independente da ação dos esteroides gonadais (OLIVEIRA, 2006). Os neurotransmissores envolvidos no controle da secreção de GnRH são os neurotransmissores excitatórios: glutamato, aspartato, neuropeptídeo Y, noradrenalina e ácido aspártico e os inibitórios: GABA, dopamina, opióides endógenos e endorfinas. Assim, aparentemente, nos bovinos, o mecanismo responsável pela contenção gonadal envolve inibição hipotalâmica, exercida pelos esteróides gonadais e inibição ou excitação central exercida por aminoácidos, peptídeos, monoaminas e gases difusíveis, conhecido como mecanismo de ação central (HORVATH et al., 2001).

2.1.1 Fatores relacionados com a puberdade

Muitos fatores influenciam diretamente o início da puberdade. A idade dos animais é um fator muito importante que se deve sempre levar em consideração, pois caracteriza a precocidade sexual dos bovinos. A produtividade dos rebanhos

bovinos de corte no Brasil é reconhecidamente baixa e parte desse atraso pode ser atribuída à idade tardia do primeiro serviço das novilhas, que é ao redor de 24-36 meses de idade (BERGMANN et al., 1996).

De acordo com Pereira et al. (2002), a idade média ao primeiro parto em rebanhos do estado de São Paulo encontra-se ao redor de 34 meses de idade, apesar de rebanhos *Bos indicus* poder alcançar idade média ao parto de 44 meses. Segundo Martin et al. (1992), o desempenho reprodutivo das fêmeas depende da idade em que essas parem pela primeira vez, e novilhas que parem mais cedo têm maior vida produtiva que as fêmeas mais tardias. Entre as vantagens em tornar gestante as novilhas mais jovens estão o menor tempo para obter retorno do investimento, aumento da vida reprodutiva da vaca, aumento do número de bezerros e seleção mais rápida das fêmeas por reduzir o intervalo entre gerações (SHORT et al., 1994; MATTOS et al., 1984).

Hess (2002) relatou que novilhas de corte precisam atingir cerca de 60 a 65% do peso vivo da idade adulta para alcançarem a puberdade. Estes achados também foram encontrados em trabalhos realizados por Lammers et al. (1999) e Quintans et al. (2004), ao verificarem a influência da taxa de ganho de peso pós-desmama sobre a idade à puberdade. Nogueira et al. (2003) trabalhando com novilhas da raça Nelore, selecionadas para precocidade verificaram que a ovulação ocorreu entre 14 e 15 meses de idade. Restle et al. (1999) ao comparar a idade á puberdade de animais da raça Charoles e Nelore, verificaram que animais *Bos indicus* apresentaram idade mais elevada a puberdade com média de 25 meses.

Portanto, a idade á puberdade tem grande impacto sobre a eficiência produtiva, reprodutiva e econômica na pecuária. Com isso a idade mais avançada ao primeiro parto irá representar perdas econômicas nas atividades de leite e corte. O momento e início deste evento fisiológico implica que a taxa de crescimento e o desenvolvimento do animal seja adequado, de forma a dar suporte aos mecanismos endocrinológicos que resultam na puberdade e maturidade sexual (MONTEIRO, 2011).

Fatores genéticos evidenciados pelas diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* indicam que em novilhas taurinas a puberdade geralmente acontece entre 10 a 15 meses e 270 a 350 kg de peso corpóreo (FERRELL, 1982). Nos zebuínos a

puberdade acontece em idade mais avançada e com maior peso em relação ao peso adulto (DOBSON et al., 1986), variando em torno de 22 a 36 meses de idade (SOUZA et al., 1995).

Assim como o peso, genética, idade, outras medidas nas novilhas podem ser tomadas como rotina em propriedades antes da entrada na estação de monta. Aliados aos parâmetros de desenvolvimento, informações do trato reprodutivo e concentrações séricas de progesterona também podem auxiliar na estimativa da puberdade sexual das fêmeas da raça Nelore (MONTEIRO, 2011).

Mensurações subjetivas da maturidade sexual em novilhas normalmente são realizadas aproximadamente 4 a 6 semanas antes do início da estação de monta (ATKINS et al., 2013). Segundo Holm et al. (2009), essa mensuração é baseada no grau de desenvolvimento do útero e condição ovariana (1 a 5). A novilha pré-púbere com útero infantil, cornos uterinos pequenos sem tônus e presença de pequenos folículos nos ovários é classificada como animal escore 1 e normalmente associado a menores taxas de gestação quando comparadas com animais de escore 4 e 5 (CL presente e cornos uterinos desenvolvidos e com tônus).

A exposição à progesterona e seus análogos tem sido utilizada para indução de ciclicidade e puberdade em bovinos de leite e corte por promover o aumento da secreção de LH durante 72 horas que se seguem a suspensão do tratamento com P4 (CLARO JUNIOR et al., 2010). Day et al. (1998) propuseram que a exposição aos progestágenos reduz a concentração de receptores de estradiol (E_2) no hipotálamo, amenizando a retro alimentação negativa sobre a liberação de GnRH, possibilitando aumento na secreção de LH. Em trabalhos realizados com novilhas expostas a progesterona por 10 dias, (ANDERSON et al. 1996) obtiveram 87,5% de puberdade no grupo tratado. Leonardi et al. (2012) encontraram uma taxa de ovulação 83,3% dos animais tratados com progesterona.

Estudos realizados com dispositivos intravaginais por 10 dias (CLARO JUNIOR et al., 2010) e (BARUSELLI et al., 2009) também mostraram a influência positiva da progesterona na indução da puberdade. Entretanto, Gottschall et al. (2011), trabalhando com fêmeas Nelore e mestiças não verificaram a influencia da progesterona injetável ou impregnada em dispositivo intravaginal, na indução da ciclicidade de novilhas previamente a estação de acasalamento.

2.2 PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES (PIVE)

Nos últimos anos, as fêmeas bovinas têm sido alvo de numerosas pesquisas visando melhorar o aproveitamento de seus gametas, principalmente daquelas consideradas geneticamente superiores (SENEDA et al., 2002). A PIVE é uma das alternativas para aumentar a capacidade de multiplicação genética, em menor período de tempo, tendo em vista da possibilidade de ser realizada semanalmente, por um longo período, mesmo em animais impúberes, pré-púberes (Adams et al. 1994), gestantes, fêmeas senis ou com infertilidade adquirida (BROGLIATTI e ADAMS., 1996).

De fato, o Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo responsável por mais de 85% da produção mundial de embriões *in vitro* SBTE (2009), com mais de 200.000 embriões/ano (VIANA et al., 2010). Esta atividade concentrou-se, principalmente, em raças zebuínas (*Bos indicus*) e seu sucesso se deve, entre outros fatores, à sua fisiologia reprodutiva, por apresentar maior número de folículos disponíveis nos ovários em relação às taurinas (*Bos taurus*) (VIANA; CAMARGO, 2007).

A PIVE vem sendo incorporada nos programas de melhoramento animal, por apresentar resultados superiores frente a outras tecnologias de produção de embriões (BASSO et al., 2006). De acordo com Loiola et al. (2014), o uso de doadoras por meio de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE) não tem alcançado bons resultados, defrontando-se com diversas limitações. Assim as pesquisas têm-se voltado para aplicação da técnica de colheita de oócitos de animais vivos, punção folicular via transvaginal, guiada por ultrassom, associada às técnicas de produção de embriões *in vitro* (SNEL OLIVEIRA et al., 2003).

Brackett et al. (1982) foram os pioneiros a relatar o nascimento de um bezerro obtido pela produção parcial *in vitro* de embriões e desde então várias alternativas foram propostas para o desenvolvimento atual. A recuperação de oócitos é a base do programa de PIVE (PIETERSE et al., 1988), e com as dificuldades para a obtenção de materiais dos matadouros, alternativas foram propostas para o melhor aproveitamento de oócitos em animais vivos (BROGLIATTI; ADAMS, 1996).

O uso da ultrassonografia tornou o procedimento mais fácil e rápido na sua aplicação (CALLESEN et al., 1987). Pieterse et al. (1988) alteraram a técnica descrita para humanos e descreveram a aspiração folicular via transvaginal (OPU-Ovum pick-up) tornando viável o aproveitamento dos gametas femininos, sem as limitações dos procedimentos existentes até então.

Com essas modificações e constante avanço a técnica tornou-se eficiente, resultado da combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção dos gametas imaturos à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo (TANEJA et al., 2000).

Após a recuperação dos oócitos, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em laboratório para a produção de embriões: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) (GARCIA et al., 2004).

O número de oócitos recuperados sofre extrema variação que pode ocorrer mesmo entre indivíduos da mesma raça (LANSBERGEN et al., 1995), raças diferentes (Dominguez, 1995), e entre os diferentes equipamentos e materiais utilizados (SENEDA et al., 2002).

Para confirmar estes achados vários estudos foram realizados com o intuito de comparar as variações. Cruz et al. (2009) observaram que o número médio de oócitos recuperados por sessão de aspiração na raça Devon foi de 4,6 oócitos, estatisticamente inferior ($P < 0,05$) aos 16,3 oócitos obtidos na raça Nelore.

Trabalhando com fêmeas Nelore, Bacelar et al. (2010) obtiveram resultados de 5,5 estruturas por procedimento. Garcia e Salaheddine (1998) ao aspirar fêmeas *Bos taurus*, encontraram valores médios de $5,4 \pm 3,7$ oócitos. Ramos et al. (2010) obtiveram resultados médios de $12,3 \pm 1,0$ por aspiração.

Bols et al. (1997) mostraram que a utilização de materiais adequados também pode influenciar na colheita dos oócitos. Ao comparar o uso de agulhas hipodérmicas descartáveis para aspiração constataram que os tamanhos de 18 e 19 Gauge (G) permitiam boa taxa de recuperação, preservando a qualidade dos oócitos. No entanto, diâmetros maiores que 19 G relacionavam-se com boas taxas de recuperação, porém com maior percentual de oócitos desnudos.

O correto ajuste da pressão de vácuo é fundamental para uma boa recuperação oocitária. Pressões maiores que 120 mmHg, destroem a camada de revestimento do *cumulus oophorus*, e pressões menores, como 50 mm Hg, são insuficientes para aspiração folicular (BOLS et al., 1996).

A maturação do oócito envolve transformação nuclear e citoplasmática, estando ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas, que torna o gameta feminino apto a ser fecundado e competente para suportar o desenvolvimento embrionário subsequente. *In vivo* esse processo inicia-se com o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) durante o estro, *in vitro* a simples retirada do oócito do folículo desencadeia a quebra da vesícula germinativa. A maturação do oócito bovino engloba a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (GONÇALVES et al., 2002), quando ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar (DEKEL, 2005). Neste momento a maturação oocitária, tanto nuclear como citoplasmática, estaciona-se novamente até o momento da fecundação, consistindo na segunda interrupção meiótica.

Diversos pesquisadores têm procurado métodos que possam ajustar da melhor forma possível os eventos desta etapa, trabalhando com diferentes métodos de maturação (NAGAI, 2001), meios de maturação (GORDON, 1994; LIM et al., 2007; COLLADO et al., 2014) sendo que a maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH) e esteróides (estradiol e progesterona) e condições controladas de atmosfera e temperatura (GOTARDI; MINGOTI, 2009).

Apesar das constantes pesquisas, apenas 40 a 50% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002). Esses valores são significativamente inferiores quando comparados àqueles maturados *in vivo*, no qual cerca de 70% dos oócitos alcançam o estágio de blastocisto mesmo quando a fecundação e o cultivo são feitos *in vitro* (LONERGAN et al., 2006).

No processo de fertilização *in vitro* são usados espermatozoides de palhetas de sêmen congelado, e a separação em gradiente de Percoll tem sido o método mais comum para a obtenção da fração espermática viva após a descongelação (GALLI; LAZZARI, 1996). Usualmente, os procedimentos para separar os

espermatozoides do plasma seminal, diluidor e/ou crioprotetores selecionam e concentram os espermatozoides normais de maior motilidade para a FIV (PARRISH et al., 1995).

Outro método utilizado para preparação de espermatozoides para a FIV, em bovinos, é o *swim-up* (migração ascendente). Baseia-se na tendência inata que os espermatozoides mais móveis apresentam, de migrarem para cima após incubação em um meio apropriado, geralmente o Tyrode com albumina, lactato e piruvato (TALP) (SHAMSUDDIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994).

SOMFAI et al. (2002), verificaram que ambas as técnicas aumentaram significativamente a proporção de células vivas, porém obtiveram maior taxa de recuperação espermática e maior percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras, após a separação em gradiente de Percoll. Assim, o gradiente descontínuo de Percoll (45%/90%) é uma das técnicas mais difundidas na PIV comercial, com uma taxa de recuperação espermática ao redor de 50%, ou seja, cinco a dez vezes maior que aquela obtida após o *swim-up* (AVERY; GREVE, 1995).

O CIV *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do embrião, quando os oócitos fecundados (embriões em estágio de uma célula ou zigoto) são transferidos para o cultivo até atingirem o estágio de blastocisto. O potencial de desenvolvimento de embriões *in vitro* é influenciado, principalmente, pelas condições estabelecidas durante o cultivo, no qual os embriões bovinos são expostos (TAKAHASHI et al., 2002; VAN SOOM et al., 2002; CORRÊA et al., 2008).

Vários fatores podem influenciar as condições de CIV, como a composição do meio, suplementação proteica, número de embriões cultivados e atmosfera gasosa (CORRÊA et al., 2008). A capacidade de desenvolvimento após a fecundação é limitada e, apesar dos progressos feitos nas condições de cultivo durante a maturação e desenvolvimento embrionário, somente em torno de um terço (33%) (LONERGAN et al., 1994) ou 15 a 20% (HENDRIKSEN et al., 2000) dos oócitos selecionados morfológicamente antes de serem submetidos a MIV, resultam em embriões viáveis. Segundo Galli et al. (2000) para cada 8 a 10 gametas colhidos em bovinos de raças europeias, resulta em torno de 2 embriões transferidos. Em animais da raça Nelore (*Bos indicus*), Dayan et al. (2000) observaram grande

variação na taxa de blastocisto entre as doadoras com média de 42% de embriões produzidos *in vitro*.

2.2.1 PIVE x idade da doadora

Doadoras de oócitos podem ser utilizadas muito precocemente, deste modo, o início de sua vida reprodutiva é muito antecipado. Assim sendo, as vacas podem produzir descendentes, praticamente desde o seu nascimento até sua senilidade (DAYAN et al., 2000).

Têm-se obtido embriões viáveis, gestações e bezerros nascidos, provenientes de oócitos de doadoras pré-púberes em diferentes idades (REVEL et al., 1995; TANEJA et al., 2000; PATEL et al., 2007). Trabalhos realizados em bezerras relatam oócitos menos competentes para se desenvolver em embriões que os de vacas (KHATIR et al., 1996; KUWER et al., 1999). Esta competência parece aumentar com a idade da bezerra, como mostrado em pesquisas realizadas por Presicce et al. (1997), em que fêmeas com idade entre 5 a 7 meses apresentaram menor competência quando comparados a idade superiores a 11 meses. Entretanto, Katska; Smorag, (1984) observaram que, quanto maior a idade do animal menor a atividade ovariana, apresentando menor número de folículos a serem aspirados.

Segundo Rizos et al. (2005), poucos estudos tem sido realizados relacionando a idade do animal doador e o desenvolvimento e competência embrionária. Mermillod et al. (1992) mostraram que o desenvolvimento embrionário de doadoras com idade entre 1 a 3 anos são melhores que animais mais velhos. Pesquisas realizadas por Galli et al. (2003) observaram que oócitos oriundos de vacas apresentaram maior taxa de clivagem quando comparado com novilhas.

Ao comparar características oocitárias e embrionárias entre novilhas e vacas holandesas (RIZOS et al., 2005), observaram que as novilhas tiveram maior número de oócitos recuperados (10,4 versus 7,8, $P < 0,001$), porém o desenvolvimento embrionário não diferiu entre os grupos. O mesmo grupo de pesquisa trabalhando com ovários de animais de abatedouros constataram que oócitos de vacas tiveram maior competência do que os oócitos oriundos de novilhas.

De acordo com Taneja et al. (2000), o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* de animais juvenis tem sido variável. Algumas explicações para este achado podem ser atribuídas à anormalidades na síntese de proteínas, incapacidade de resposta a certos meios utilizados como o soro ou suplementação com fluido folicular durante a maturação *in vitro* (KHATIR et al. 1997), e mesmo o atraso na migração de organelas citoplasmáticas e incompleta maturação dos oócitos (DAMIANI et al., 1996).

2.3 PROGESTERONA (P4)

A progesterona e seus análogos têm sido utilizados para diversas finalidades, e em várias aplicações clínicas (GOLETIANI et al., 2007), como indução da puberdade em novilhas (Rodrigues et al., 2013), auxiliar no tratamento de patologias do trato reprodutivo, e principalmente em protocolos de sincronização de estro (BO et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2009).

A P4 junto com os corticosteroides, os estrógenos e os andrógenos são os hormônios que compõem à classe dos esteróides. Possui o nome químico Pregna-4-ene-3,20-diona, é produzida pelo córtex adrenal, gônadas e placenta. Este progestágeno natural modula várias funções reprodutivas como, o crescimento folicular, nutrição inicial do embrião (MANN; LAMMING, 2001), e bloqueio da expressão do estro e ovulação por ação no hipotálamo (COLAZO et al., 2007). A produção ocorre durante o ciclo estral normal seguido ou não de gestação por uma glândula transitória, o corpo lúteo (NASCIMENTO et al., 2013), e sua função é preparar o endométrio para manter uma possível gestação. O ambiente uterino devidamente preparado pela progesterona fornece as condições mais favoráveis para o desenvolvimento do conceito (BINELLI, 2000).

Os mecanismos que envolvem a produção de P4 em ruminantes tem a participação de apenas duas enzimas, a P450 de clivagem de colesterol em cadeia (CYP11A1) e a 3B-hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B) e uma proteína carreadora, a proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR). Essas moléculas são responsáveis, respectivamente, pela conversão do colesterol em pregnenolona,

conversão da pregnenolona em P4 e o transporte do colesterol para dentro da membrana mitocondrial (NASCIMENTO et al., 2013). A metabolização se dá por meio do sistema hepático e segundo pesquisadores (RODRIGUES et al., 2013; ALVES et al., 2009; SANTOS, 2005) a nutrição tem um importante papel na concentração circulante de progesterona.

Apesar da importância da P4 para o estabelecimento e manutenção da gestação em mamíferos, paradoxalmente, ocorre à interrupção da expressão de receptores de progesterona no epitélio endometrial antes da implantação do embrião que parece ser um pré-requisito para o reconhecimento materno da gestação e desenvolvimento inicial do embrião em mamíferos. (LONERGAN, 2011).

A fase progesterônica é a mais longa do ciclo estral dos bovinos com duração entre 10 a 14 dias. Nesta fase o corpo lúteo continua a se desenvolver atingindo o máximo de seu crescimento e produção de P4. As concentrações plasmáticas de progesterona dos bovinos apresentam variações durante o ciclo estral normal, com concentrações abaixo de 1ng/mL no estro e valores máximos entre 2 e 3 ng/mL para vacas de raças zebuínas (ADEYEMO e HEATH, 1980) e 16,0 ng/mL em vacas da raça Holandesa (BADINGA et al., 1994) ao 10º dia, essas concentrações são mantidas elevadas até o início da regressão do CL, caso não ocorra gestação.

Sob a ação deste hormônio o útero se apresenta com a musculatura relaxada e o endométrio espessado com glândulas hipertrofiadas. A cérvix permanece fechada com muco denso e viscoso, a vagina apresenta-se com as mucosas pálidas, secas e caso o conceito esteja presente entre os dias 14 e 17 do ciclo ocorrerá à secreção de uma glicoproteína (interferon, IFN-T). O IFN- τ produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de estradiol (ER) no endométrio que não terá possibilidade de promover a liberação dos pulsos de PGF2 α essenciais à luteólise e a progesterona continuará a ser secretada para manter a gestação (ALBUQUERQUE et al., 2004).

2.3.1 Progesterona x reprodução

A progesterona e os progestágenos podem ser administrados de diferentes modos na reprodução: por meio de esponjas impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou progesterona natural (P4); no alimento (MGA); implantes subcutâneos com norgestomet; dispositivos intravaginais de silicone com liberação lenta de progesterona natural (P4) ou progesterona injetável (CORRÊA et al., 2008).

Sua utilização é datada na década de 50 e com o surgimento dos protocolos de sincronização de estro tornou-se fundamental para a pecuária atual (TORRES-JÚNIOR et al., 2009). A partir de então, vários protocolos de sincronização foram desenvolvidos (Pursley et al., 1995), buscando as melhores taxas de concepção e melhores formas de utilização tanto em vacas de corte (BARUSELLI et al., 2004, BARUSELLI et al., 2006; VIANA et al., 2008), quanto em vacas de leite (SOUZA et al., 2009). Sua função na sincronização é inibir o desenvolvimento de um possível corpo lúteo ou para prevenir a ovulação.

Inicialmente os progestágenos eram constituídos por um implante hidrônico subcutâneo de norgestomet (6 mg) (Sycromate B[®]) (WILTBANK; GONZALES-PADILLA, 1975), posteriormente foi lançado outro dispositivo semelhante, porém com uma tecnologia diferenciada, em que o progestágeno é impregnado em silicone, resultando em uma liberação mais constante do produto (KESLER et al., 1995). E atualmente a forma mais utilizada são os dispositivos intravaginais de liberação de progesterona, contendo de 1,0 a 1,9g de P4 (BO et al., 2003).

As perdas embrionárias durante a fase inicial da gestação ocorrem principalmente por influência de dois fatores primordiais, a qualidade do oócito ovulado e o suporte uterino ao desenvolvimento embrionário. A administração de doses subluteais de P4 exógena na ausência de CL resulta em um padrão de secreção de LH semelhante ao que se verifica na fase folicular em bovinos. A alteração da regulação de liberação de LH pela P4 pode afetar o desenvolvimento e a capacidade futura do oócito de ser fertilizado e resultar em gestação. Quando o período de exposição a concentrações subluteais de P4 é muito prolongado,

folículos persistentes se desenvolvem, com drástica redução de fertilidade (KINDER et al., 1996).

Várias estratégias anti-luteolíticas tem sido usadas para aumentar a qualidade embrionária e os índices gestacionais. Binelli et al. (2001) propuseram estratégias que visam estimular o aumento do folículo ovulatório, formação de um CL acessório e suplementação com progesterona exógena em diferente momentos. Apesar dos indicativos do efeito benéfico do aumento das concentrações de P4 no desenvolvimento embrionário em bovinos, os resultados de fertilidade em estudos objetivando elevar-se a P4 são comumente conflitantes e inconclusivos (LONERGAN, 2011).

Outras estratégias empregadas são a formação de CL acessórios por meio de aplicações de GnRH, hCG e suplementação com P4 injetável (MACHADO et al., 2006). A suplementação injetável de P4 também tem sido uma estratégia muito empregada pelos grupos de pesquisas e seus resultados têm relatado que a concentração e o momento da aplicação são fundamentais para o incremento nas taxas de gestações, pois, baixas concentrações plasmáticas de progesterona durante a gestação inicial estão associadas com concepto pouco desenvolvido (BINELLI et al., 2001).

2.3.2 Progesterona longa ação

O uso da progesterona injetável de longa ação tem sido reportado em estudos como forma alternativa de suplementação de P4 por ser prático e diminuir o manuseio com os animais. A demanda para o desenvolvimento de uma formulação de progesterona de longa ação em veículo biodegradável para uso nas espécies domésticas é crescente (RATHBONE et al., 1998). Foi demonstrado que uma única aplicação intramuscular de um produto à base de progesterona, em microesferas biodegradáveis, possibilita controlar a ovulação e manter a concentração sérica desejável de progesterona por dias ou meses (BLANCHARD et al., 1992; BURNS et al., 1993).

Whisnant e Burns (2002) verificaram em seu estudo com novilhas, que as concentrações de P4 em preparação de microesferas mantiveram-se elevadas por 12-13 dias, e pico de concentração de até 5 ng/mL de P4. Lima et al. (2007), encontraram concentração média de progesterona circulante de 2,87 ng/mL, após a administração de doses de 450 e 750 mg de P4 injetável, com valores máximos de 5 e 6 ng/mL em bezerras Nelore e mestiças.

Estudos adicionais que investigaram as concentrações de progesterona durante os protocolos de sincronização de estro indicam que a utilização de fontes exógenas de P4 se comporta de diferentes formas, dependendo da espécie (*Bos taurus* e *Bos indicus*), categoria (vacas lactentes e novilhas), e aptidão (leite e corte). Algumas pesquisas utilizaram no momento da inserção do dispositivo associado a uma fonte de estrógeno, mas essa progesterona adicional não se mostrou vantajosa na indução de uma nova onda, na taxa de ovulação final do tratamento e nas taxas de gestação após a IATF (BO et al., 2003).

Foram realizados estudos para avaliar a influência que a progesterona exerce em diferentes fases do ciclo estral em bovinos. Resultados recentes têm relatado que a utilização da progesterona injetável de longa ação em momentos pós-inseminação tanto em animais de leite (PARR et al., 2014) quanto de corte (BELTMAN et al., 2009), resultaram em aumento nas taxas de concepção (PUGLIESI et al., 2015).

Assim, a suplementação de P4 exógena, por meio da injeção ou da inserção de um dispositivo intravaginal, resulta em imediato aumento da concentração circulante de P4 (PUGLIESI et al., 2014), e ao invés, do uso de implantes intravaginais ou do uso repetido de P4 injetável como reportado em estudos anteriores (GARRETT et al., 1988; CARTER et al., 2008), uma alternativa é utilizar P4 injetável de longa ação em uma única administração.

A P4 injetável de longa ação, é uma progesterona natural de liberação lenta, na concentração de 150 mg/mL. Sua ação em vacas sem a presença de CL e pré-sincronizadas, foi suficiente para manter as concentrações de progesterona acima de 1 ng/mL, por pelo menos 7 dias (Figura 1).

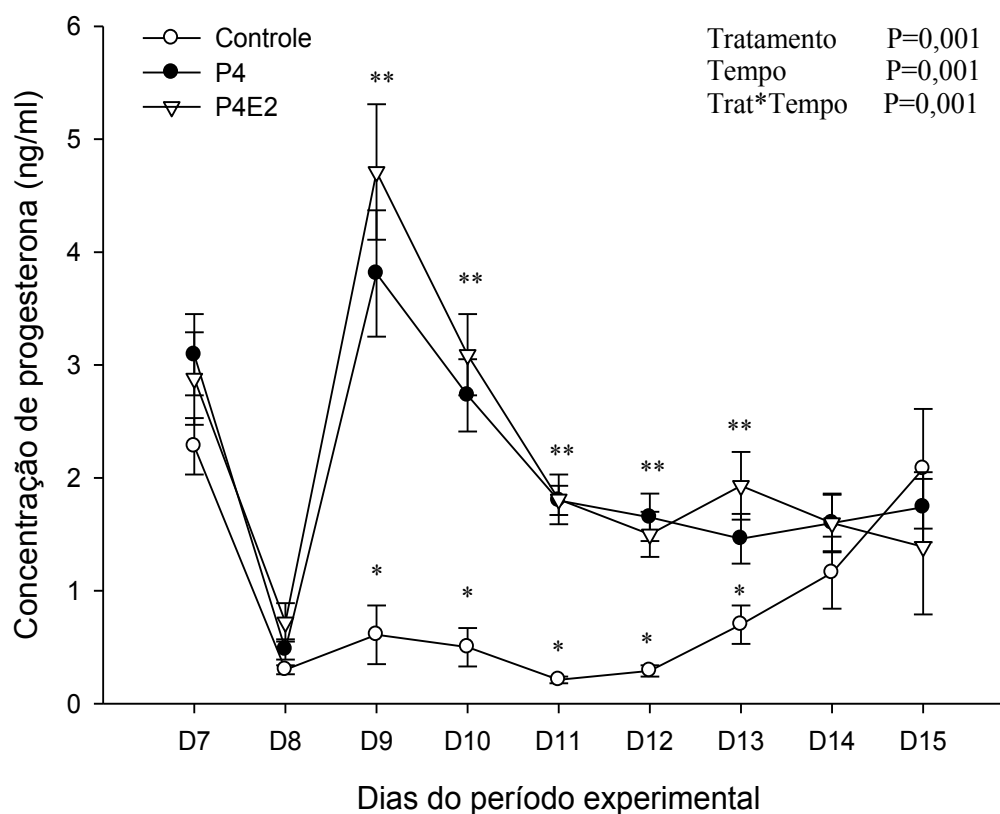


Figura 1. Perfil plasmático de vacas Nelore não lactante, tratadas com progesterona injetável longa ação, administrada 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.

A dose e o momento de aplicação da P4 injetável no presente trabalho foi baseado em estudo prévio desenvolvido pela empresa Ourofino Saúde Animal, em que foi observado o perfil plasmático da progesterona injetável em vacas de corte Nelore sem a presença de CL e pré- sincronizadas.

3 OBJETIVO

Avaliar a influência da progesterona injetável longa ação no número e na qualidade de oócitos recuperados, e na produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore pré-púberes.

4 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A progesterona injetável longa ação interfere positivamente na quantidade, qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore pré-púberes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Comitê de ética

Certifica-se que o protocolo n. 022455/14 do trabalho de pesquisa intitulado “Efeito da progesterona piv em novilhas nelore pré-púberes” esta de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESP/FCAV- Jaboticabal.

5.2 Local e período

O experimento foi realizado em dois locais: as etapas de campo foram realizadas na fazenda João Martins, localizada no município de Guataporã, SP, (latitude: 21° 29' 48" S, longitude: 48° 02' 16" O, altitude de 512 metros). A propriedade encontra-se distante 60 quilômetros (Km) do município de Jaboticabal,

SP, (latitude: 21° 15' 17" S longitude: 48° 19' 20" O, altitude de 605 metros) onde realizou-se as etapas laboratoriais da PIVE no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP-Jaboticabal. Todas as etapas foram desenvolvidas entre os meses de março a agosto de 2014. Os animais não precisaram de um período de adaptação, pois, pertenciam à propriedade de estudo e já estavam acostumados ao manejo realizado.

5.3 Animais doadores de oócitos, tratamento e delineamento experimental

Foram selecionadas 31 fêmeas bovinas da raça Nelore sem registro genealógico, de um total de 127 animais. Os animais foram pré-selecionados baseando-se na avaliação da idade (controle de nascimentos), peso corporal e condição ovariana, quanto ao número de folículos e ausência de corpo lúteo (Tabela 1). As fêmeas doadoras de oócitos no início do período experimental estavam com idade entre 18 a 20 meses, o peso corporal médio de 268 Kg e escore de condição corporal (ECC) igual a 3 na escala de 1 a 5 pontos (CACHAPUZ, 1997). Após a seleção os animais foram identificados (brincos) e separados das fêmeas restantes. Ao final do período experimental os animais estavam com idade entre 23 a 25 meses, e o peso corporal médio de 327 kg.

As doadoras foram mantidas em pastagens de *Brachiara humidícula*, com mineralização (comercial) e livre acesso à água. Neste período não receberam nenhum tipo de suplementação e foram mantidas isoladas dos machos, para evitar a possibilidade de acasalamento e, também, para evitar a bioestimulação (QUADROS; LOBATO, 2004).

Foi utilizado a progesterona injetável longa ação (15g/ veículo q.s.q 100mL), partida 001/13, data de fabricação jun/13. Os animais foram separados em dois grupos de 10 animais e um de 11 animais. Os que foram tratados com progesterona receberam o referido fármaco na dose de 150 mg em 1 mL, e os não tratados (grupo controle) receberam 1 mL de solução placebo oleosa.

As aspirações foliculares foram realizadas a cada 28 dias de intervalo e sempre pelo mesmo técnico. As doadoras de oócitos foram divididas em 3 grupos experimentais da seguinte maneira:

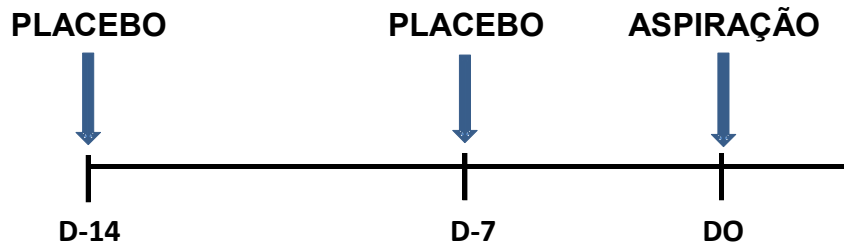


Figura 2. Grupo P0 (n=31): Os animais receberam duas aplicações de solução oleosa placebo (1 mL), com intervalo de 7 dias iniciando 14 dias (D 14) antes da primeira aspiração (D 0).

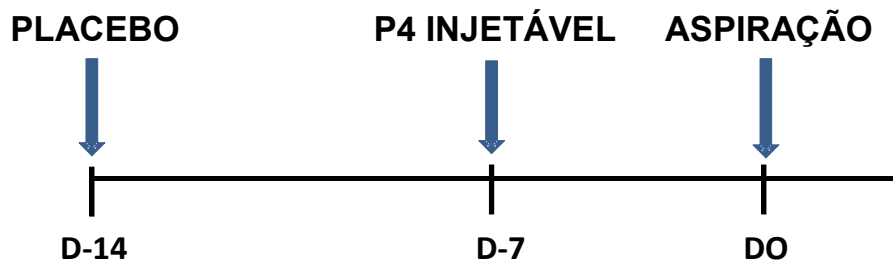


Figura 3. Grupo P7 (n=31): Os animais receberam uma aplicação de solução oleosa placebo (1 mL) 14 dias (D14) antes e uma de progesterona injetável (150 mg) 7 dias (D7) antes da aspiração.

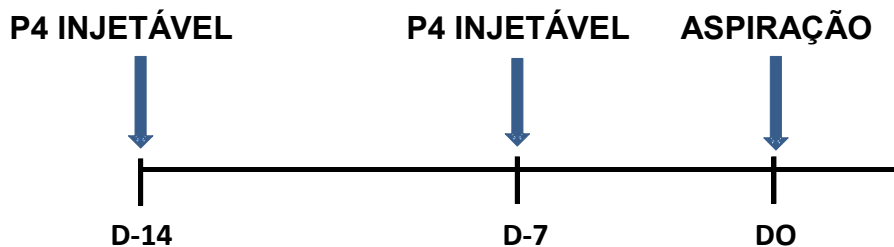


Figura 4. Grupo P14 (n=31): Os animais receberam duas aplicações de P4 injetável (150 mg) com intervalo de 7 dias, a primeira 14 dias (D14) e a segunda 7 (D7) dias antes da aspiração.

As avaliações ultrassonográficas iniciaram 35 dias antes do início do experimento (D-35) até o final da última sessão de aspiração (término do experimento à campo) (item 5.5). Para ajudar na detecção de possíveis sinais de estro, durante todos os dias de trabalho foi realizada marcação do posterior dos animais com bastão marcador Animal Marking Crayon (RAIDL MAXI). Para a formação dos grupos realizou-se a randomização dos animais conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Número dos bovinos, constituição dos grupos, pesos, número de folículos e dose medicamentosa de novilhas Nelore pré-púberes.

Número do bovino	Grupo	Peso (kg)	número de folículos	Dose (mg)
525	GRUPO PO	358	19	-
527		350	12	-
590		303	18	-
516		308	14	-
490		278	15	-
183		277	30	-
600		275	35	-
473		250	16	-
586		244	20	-
485		244	4	-
746		240	11	-
511	GRUPO P7	363	20	150
201		324	25	150
498		288	20	150
526		295	13	150
589		288	11	150
602		267	33	150
238		292	10	150
581		256	15	150
739		240	14	150
486		242	9	150
515	GRUPO (P14)	344	14	(2X)150
510		322	30	(2X)150
593		299	6	(2X)150
591		297	12	(2X)150
588		296	16	(2X)150
474		290	35	(2X)150
580		281	10	(2X)150
529		280	12	(2X)150
484		234	14	(2X)150
751		231	18	(2X)150

Após 14 dias da primeira aspiração, iniciou-se o segundo ciclo de tratamento. Para tal os 3 grupos foram divididos em delineamento **crossover** para que todas as fêmeas passassem por todos os tratamentos até o final da terceira aspiração.

5.4 Aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões (PIVE)

As aspirações foliculares foram realizadas com auxílio de ultrassom conectado a uma guia de aspiração transvaginal. As colheitas dos oócitos foram realizadas com agulhas hipodérmicas descartáveis 20G (0,9 x 50 mm; Terumo, São Paulo, Brasil), e sistema de aspiração Handle Cook (Cook, Queensland, Australia) acoplado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL. Utilizou-se uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil), com pressão ajustada entre 60 e 70 mmHg. Antes do início de cada aspiração os animais devidamente contidos recebiam anestesia epidural baixa com 3 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e higienização da região perineal com água e álcool 70%.

Os procedimentos mecânicos de colheitas dos oócitos consistiram em inserir o transdutor do ultrassom acoplado à guia de aspiração até o fórnix vaginal (fundo de saco), posicionando os ovários no campo de visualização do ultrassom e o mais próximo possível do transdutor (linha de punção). A partir deste momento a bomba de vácuo era ligada e iniciava-se o procedimento de aspiração dos folículos visíveis.

Os oócitos aspirados ficavam depositados em PBS (Phosphate-buffered saline; acrescido de 10.000 UI/L de Heparina (Liquemine, Roche Químicos e Farmacêuticos, Rio de Janeiro, Brasil). Logo após as aspirações o sistema era lavado com o meio de punção e o material coletado encaminhado imediatamente para um laboratório montado em uma sala ao lado do curral onde o animal era contido.

No laboratório inicialmente os oócitos recuperados foram lavados com PBS em filtro de colheita de embriões até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. O sedimento restante no filtro (PBS + oócitos) foi depositado em placas de Petri, para a procura e seleção. Posteriormente, com uso de um estereomicroscópio, efetuava-se a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos classificando-os de acordo com o modelo proposto por De loos et al. (1991), da seguinte maneira:

Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto e ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;

Grau II: revestimento de 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;

Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas), ooplasma irregular com picnose;

Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos;

Grau V ou Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Após a avaliação, os oócitos classificados como grau I, II e III foram transportados em criotubos contendo meio de maturação sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ e 12% de O₂ e temperatura controlada de 36°C até o laboratório de PIVE da Unesp- Jaboticabal.

5.4.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

5.4.2 Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

A maturação ocorreu por 24 horas, sendo 6 a 8 horas de transporte nos criotubos e de 16 a 18 horas no laboratório em microgotas de 100 µL de meio de maturação (Apêndice 1), sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

5.4.3 Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

Para a fecundação utilizou-se sêmen de um único touro, dose convencional, pertencente à mesma partida e lote de fabricação e com histórico favorável na PIVE. Os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL Sêmen (Apêndice 2) e uma vez em FIV gotas (Apêndice 3) para remoção do meio de MIV. Após este procedimento, os oócitos de cada grupo experimental foram transferidos para gotas de 100 µL de meio FIV gotas sob óleo mineral. Foi utilizado sêmen convencional do mesmo touro para a fecundação de todos os oócitos do experimento. O sêmen foi descongelado seguindo o padrão preconizado pela Associação Brasileira da Inseminação Artificial (ASBIA), em água a 35-37°C por 20 segundos (palheta fina) e colocado para centrifugação em gradiente de Percoll (45% e 90%) (Apêndice 4) para

seleção e recuperação dos espermatozoides móveis. Foram colhidos 30 µL do sedimento selecionado pelo Percoll e colocados em outro tubo ependorff contendo 30 µL de meio FIV gotas pré-equilibrado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 95 µL de meio FIV gotas para avaliação da motilidade e mais 5 µL de sêmen em 250 µL de água para cálculo da concentração. O volume do sedimento foi ajustado para concentração final de 25×10^6 espermatozoides vivos/mL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos foram adicionados 8 µL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, espermatozoides e oócitos foram co-incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

5.4.4 Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após aproximadamente 20h de fecundação, os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen, onde tiveram parte das células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados uma vez em meio de desenvolvimento (SOFaa) (Apêndice 5) e transferidos para microgotas de 100 µL contendo o mesmo meio. A troca de meio (feeding) foi realizada no terceiro e quinto dia de cultivo, onde eram retirados 50 µL de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50 µL de meio SOFaa fresco (pré-equilibrado). Os embriões foram co-incubados em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

5.5 Avaliações ultrassonográficas e colheita de sangue para dosagem de progesterona

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas conforme a Figura 3, iniciando 35 dias antes da primeira aspiração (D-35), e 21 dias antes da formação dos grupos, com o objetivo de avaliar a ciclicidade dos animais, finalizando no dia da última aspiração folicular (término do experimento à campo). O ultrassom utilizado foi o (Aloka SSD-500, Tokyo, Japan) e transdutor transretal na frequência de 5 MHz.

A partir do início da formação dos grupos em todos os procedimentos realizados como exames ultrassonográficos, tratamentos e aspirações foliculares foram realizadas colheitas de sangue para quantificação da concentração sérica de progesterona pela artéria coccígena (figura 3). Foi utilizado o sistema fechado à vácuo (vacutainer®) em tubos de coleta de 10 ml (BD, São Paulo, Brasil). As amostras coletadas foram acondicionadas a uma temperatura de 4 a 6 °C por um período de 1 a 4 horas, centrifugadas a 3600 G por 20 minutos e armazenadas a -20 °C até a análise da concentração de progesterona pelo método de radioimunoensaio.

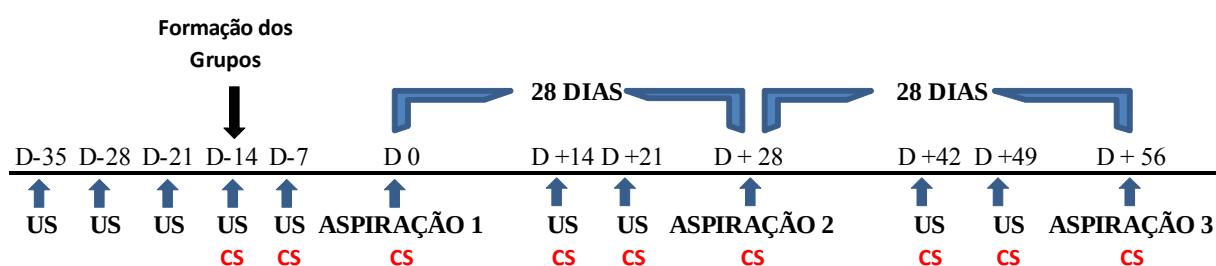


Figura 5. Representação esquemática das coletas sanguíneas para dosagem de progesterona, avaliações ultrassonográficas e aspiração folicular em novilhas da raça Nelore. US, Ultrassonografia; D, dias; CS, coleta de sangue- para determinação da concentração sérica de progesterona.

5.6 Dosagem de Progesterona Sérica

As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal, da UNESP, Araçatuba, SP. Para a realização das dosagens utilizou-se o Kit de radioimunoensaio de acordo com as recomendações do fabricante (IMMUNOTECH® - Beckman Coulter/ RIA- progesterone). As amostras foram processadas em dois ensaios e a sensibilidade dos ensaios foi de 0,03 ng/ml, o coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi de 1,05% e 1,44%, respectivamente, e o inter-ensaio foi de 4,48%.

Alíquotas de 50µl de calibradores, controle e soro e 500 µL de P4 marcada [I-125] foram acrescentadas em tubos com anticorpos contra P4 aderidos à parede por um período de 1 hora com temperatura entre 18 a 25 °C e agitação constante. Após a incubação, foi removido todo o líquido dos tubos, e os mesmos foram deixados por um minuto em contador gama para quantificar a concentração de P4.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software R® 3.0.3 foi utilizado para realizar as análises, após a confirmação da homocedasticidade (BoxCox) e normalidade (teste de Cramér-von Mises) dos dados, realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para as comparações das médias das variáveis. Para as correlações dos dados foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Os dados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

As variáveis descritas no trabalho foram analisadas separadamente da seguinte forma. Primeiramente verificou-se a influencia do tratamento com progesterona injetável longa ação (Sincrogest®) apenas nas doadoras que se mantiveram sem a presença de CL, durante todo período experimental. Posteriormente, foi verificado a influencia do tratamento com P4 exógena nos animais que apresentaram ciclicidade (progesterona endógena, CL). Assim, das 31 doadoras, 10 apresentaram corpo lúteo (P4 endógena) e 21 animais mantiveram-se

sem a presença de CL durante todo experimento. As informações dos animais com CL foram comparadas com as dos animais sem CL.

7 RESULTADOS

7.1 Dosagem de Progesterona Sérica

Na Tabela 2 estão apresentados os dados das interações entre presença/ausência de CL, momentos, grupos, média e desvio padrão das fêmeas doadoras de oócitos quanto às concentrações séricas de progesterona. Nos animais que apresentaram CL a concentração sérica média de P4 dos grupos tratados e controle foi de $4,35 \pm 3,93$ ng/mL, já nos animais sem CL, foi de $2,36 \pm 2,10$ ng/mL. Nas fêmeas pré-púberes e púberes os grupos tratados diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, mas não diferiram entre si ($p > 0,05$). O grupo controle nas fêmeas pré-púberes apresentou concentração média de $1,90 \pm 1,85$ ng/mL e os animais dos grupos P7 e P14 uma concentração média de P4 de $2,92 \pm 2,11$ ng/mL e $2,25 \pm 1,85$ ng/mL, respectivamente.

Tabela 2. Médias ajustadas ($\pm$ desvio padrão) dos grupos (P0, P7 e P14), quanto a concentração sérica de progesterona em ng/mL de novilhas Nelore pré-púberes (S/CL) e púberes (C/CL), Guatapar, SP, 2014.

CL (p<0,0001)	Momentos de coletas	Tratamentos (p=0,002)			Total
		P0	P7	P14	
C/CL (n=10)	-14	1,66 $\pm$ 1,49 ^{Bb}	4,09 $\pm$ 3,54 ^{Ba}	4,94 $\pm$ 4,66 ^{Ba}	4,35 $\pm$ 3,93 ^A
	-7	3,33 $\pm$ 4,32 ^{Ab}	6,58 $\pm$ 5,22 ^{Aa}	5,91 $\pm$ 4,07 ^{Aa}	
	0	3,32 $\pm$ 3,71 ^{Ab}	4,79 $\pm$ 3,39 ^{Aa}	4,55 $\pm$ 2,60 ^{Aa}	
Total C/CL		2,77 $\pm$ 3,17^b	5,15 $\pm$ 4,05^a	5,13 $\pm$ 3,77^a	
S/CL(n=21)	-14	1,71 $\pm$ 1,77 ^{Bb}	1,70 $\pm$ 1,70 ^{Ba}	1,90 $\pm$ 1,72 ^{Ba}	2,36 $\pm$ 2,10 ^B
	-7	2,35 $\pm$ 2,41 ^{Ab}	2,45 $\pm$ 2,18 ^{Aa}	3,88 $\pm$ 3,32 ^{Aa}	
	0	1,64 $\pm$ 1,38 ^{Ab}	2,60 $\pm$ 1,68 ^{Aa}	3,00 $\pm$ 1,31 ^{Aa}	
Total S/CL		1,90 $\pm$ 1,85 ^b	2,25 $\pm$ 1,85 ^a	2,92 $\pm$ 2,11 ^a	
TOTAL		2,24 $\pm$ 2,60 ^b	3,37 $\pm$ 3,28 ^a	3,78 $\pm$ 3,19 ^a	3,12 $\pm$ 3,09

a,b - Letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente;
P<0,05.

A,B - Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;
P<0,05.

7.2 Novilhas pr-púberes (sem CL)

Na Tabela 3 estão apresentados os dados referentes ao número de estruturas recuperadas, oócitos viáveis (Grau I, II, III), atrésicos e desnudos de novilhas Nelore pr-púberes expostas ou não ao tratamento com progesterona injetável longa ação.

Ao final de três aspirações foliculares não foram observadas diferenças (p>0,05) quanto ao número de oócitos recuperados (oócitos totais), oócitos viáveis (G I, II, III), entre os animais que receberam tratamento progesterona exógena (grupos P7 e P14) em relação aos animais que não receberam progesterona (grupo P0) durante o delineamento **crossover**. As doadoras apresentaram uma média de 14,98 $\pm$ 10,82 oócitos coletados por sessão de aspiração.

Tabela 3. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), dos grupos (P0, P7 e P14), oócitos de grau 1 (GI), oócitos de grau 2 (GII), oócitos de grau 3 (GIII), de novilhas Nelore pré-púberes, Guatapar, SP, 2014.

RESULTADOS	GRUPOS/ TRATAMENTO		
	P0 (n= 21)	P7 (n= 21)	P14 (n= 21)
GI	1,16 $\pm$ 1,65	1,38 $\pm$ 1,96	1,07 $\pm$ 1,95
GII	2,32 $\pm$ 3,31	2,76 $\pm$ 2,28	1,50 $\pm$ 1,92
GIII	7,00 $\pm$ 5,64	7,88 $\pm$ 7,05	7,23 $\pm$ 6,27
ATRÉSICOS	1,52 $\pm$ 1,85	1,69 $\pm$ 1,69	2,00 $\pm$ 2,52
DESNUDOS	1,84 $\pm$ 2,80	1,34 $\pm$ 1,76	2,30 $\pm$ 2,05

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As médias e desvio padrão das taxas (%) de oócitos viáveis e de embriões produzidos não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos. Os grupos P0, P7, P14 obtiveram uma taxa de 76,34%, 79,62% e 67,93% de oócitos viáveis, e taxa de embriões produzidos de 35,56%, 41,91% e 42,59%, respectivamente. Os grupos P0, P7 e P14, obtiveram média de $4,04 \pm 4,80$, $5,03 \pm 4,44$ e $4,43 \pm 4,66$ embriões produzidos por sessão de aspiração, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), dos grupos (P0, P7 e P14), quanto a taxa de oócitos viáveis e embriões produzidos de novilhas Nelores pré-púberes, Guatapar, SP, 2014.

VARIÁVEIS	GRUPOS/ TRATAMENTO					
	P0 (n= 21)		P7 (n= 21)		P14 (n= 21)	
N. OÓCITOS TOTAIS	14,88	11,28	15,07	10,96	15,00	10,27
N. OÓCITOS VIÁVEIS	11,36	8,45	12,00	9,04	10,19	8,07
TAXA DE OÓCITOS VIÁVEIS * (%)	76,34		79,62		67,93	
EMBRIÕES PRODUZIDOS	4,04	4,80	5,03	4,44	4,34	4,66
TAXA DE EMBRIÕES ** (%)	35,56		41,91		42,59	

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

*Oócitos viáveis/ Oócitos totais

**Embriões produzidos/ oócitos viáveis

7.3 Novilhas que apresentaram CL x novilhas sem CL

As novilhas que foram confirmadas com presença de corpo lúteo foram analisadas quanto às mesmas variáveis do grupo de novilhas pr-púberes (sem CL). Os resultados foram comparados conforme segue abaixo. Na Tabela 5, estão demonstrados os dados comparativos entre os animais com e sem CL quanto ao número de estruturas recuperadas e a qualidade oocitária.

Tabela 5. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão) da comparação das variáveis oocitárias dos grupos com CL (púberes) e sem CL (pré-púberes) de novilhas Nelore, Guatapar, SP, 2014.

VARIÁVEIS	GRUPOS/ TRATAMENTO	
	Com CL (n= 10)	Sem CL (n= 21)
GI	0,73 $\pm$ 1,31	1,28 $\pm$ 1,93
GII	1,53 $\pm$ 1,52	2,36 $\pm$ 2,71
GIII	5,60 $\pm$ 7,55	8,31 $\pm$ 6,40
ATRÉSICOS	1,50 $\pm$ 1,61	1,76 $\pm$ 2,14
DESNUDOS	1,03 $\pm$ 1,09	1,95 $\pm$ 2,39

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Ao comparar entre os grupos as variáveis oocitárias (oócitos viáveis, atrésicos, desnudo e oócitos totais) foi verificado que os animais do grupo sem corpo lúteo apresentaram diferenças ($p<0,05$) quanto ao número de estruturas recuperadas (16,07 $\pm$ 11,03 *versus* 11,16 $\pm$ 9,75). Porém o número de oócitos atrésicos e desnudos não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos.

Na Tabela 6 estão apresentados os dados comparativos referentes à influência do tratamento com P4 exógena nos animais com presença ou não de corpo lúteo. Verificou-se que os animais com CL produziram menor quantidade de oócitos viáveis (8,16 $\pm$ 8,94) e totais (11,16 $\pm$ 9,75) ($p<0,05$) quando comparado ao grupo sem corpo lúteo (12,30 $\pm$ 8,64) e (16,07 $\pm$ 11,03). Porém a taxa de oócitos viáveis e de embriões produzidos não diferiu entre os grupos ($p>0,05$). A média de embriões produzidos foi de 4,16 $\pm$ 5,16 (grupo CL) e grupo sem 4,74 $\pm$ 4,86 (grupo sem) por sessão de aspiração.

Tabela 6. Médias gerais ajustadas ($\pm$ desvio padrão), da comparação das variáveis oocitárias (taxa de oócitos viáveis) e embrionária (taxa de embriões produzidos dos grupos com CL (púberes) e sem CL (pré-púberes), de novilhas Nelore, Guatapar, SP, 2014.

VARIÁVEIS	GRUPOS/ TRATAMENTO	
	Com CL (n= 10)	Sem CL (n= 21)
N. OÓCITOS TOTAIS	11,16 $\pm$ 9,75 ^b	16,07 $\pm$ 11,03 ^a
N. OÓCITOS VIÁVEIS	8,16 $\pm$ 8,94 ^b	12,30 $\pm$ 8,64 ^a
TAXA DE OÓCITOS VIÁVEIS * (%)	73,11	76,54
EMBRIÕES PRODUZIDOS	4,16 $\pm$ 5,16	4,74 $\pm$ 4,86
TAXA DE EMBRIÕES ** (%)	50,98	38,53

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

*Oócitos viáveis/ Oócitos totais

**Embriões produzidos/ oócitos viáveis

A Tabela 7 mostra os resultados do teste de correlação de Pearson entre as variáveis oócitos viáveis (OV), oócitos totais (OT), embriões produzidos (EP), taxa de produção (TXP), grau (GI), (GII), (GIII), atrésicos (A), desnudos (D), PESO e ganho de peso (GP). Houve alta correlação ($p < 0,05$) entre OV e OT, EP e TXP, GIII e OV, OT. O ganho de peso dos animais durante o período experimental não foi correlacionável com a qualidade oocitária e na produção de embriões. A qualidade oocitária não teve correlação significativa com a produção de embrião.

Tabela 7. Valor de R da correlação Pearson para oócitos viáveis (OV), oócitos totais (OT), embriões produzidos (EP), taxa de produção de embrião (TXP), oócitos grau 1 (GI), oócitos grau 2 (GII), oócitos grau 3 (GIII), atrésicos (A), desnudos (D), peso corporal (PESO) e ganho de peso (GP) de novilhas Nelore pré-púberes, Guatapar, SP, 2014.

	OV	OT	EP	TXP	GI	GII	GIII	A	D	PESO	GP
OV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OT	0.94*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EP	0.70	0.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TXP	-0.17	-0.16	0.38*	-	-	-	-	-	-	-	-
GI	0.55	0.52	0.42	-0.04	-	-	-	-	-	-	-
GII	0.53	0.45	0.35	-0.08	0.39	-	-	-	-	-	-
GIII	0.89*	0.84*	0.69	-0.14	0.35	0.25	-	-	-	-	-
A	0.27	0.49	0.30	-0.02	0.03	0.00	0.33	-	-	-	-
D	0.33	0.55	0.38	0.02	0.34	0.09	0.31	0.43	-	-	-
PESO	0.06	0.05	-0.19	-0.20	-0.09	0.06	0.01	0.01	-0.11	-	-
GP	0.09	0.18	0.10	-0.02	-0.04	-0.15	0.12	0.14	0.12	0.16	-

*Denota significância do teste ($p < 0,05$)

8 DISCUSSÃO

O tratamento de fêmeas bovinas com progestágenos tem sido alvo de pesquisas com o objetivo de incrementar os resultados tanto em programas de IATF quanto na produção de embriões *in vitro*. Na OPU os oócitos aspirados e produzidos através da PIV são obtidos em fases aleatórias do ciclo estral, portanto o seu desenvolvimento acontece em diferentes etapas e são expostos a diferentes concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH. Estes fatores podem influenciar na competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro* (WIT et al., 2000).

No presente experimento utilizou-se a P4 injetável longa ação em novilhas Nelore pré-púberes para avaliar a sua influencia na quantidade e qualidade oocitária e na produção de embriões produzidos *in vitro*. A hipótese deste trabalho é que a P4 permite que o folículo seja exposto por um maior período a pequenos pulsos de LH podendo melhorar a qualidade oocitária e consequentemente a produção de embriões.

Considerando o número de procedimentos realizados, e os resultados encontrados o uso de animais jovens indica ser uma enorme possibilidade de multiplicação de genética por meio das técnicas de OPU-FIV. Após os três procedimentos de aspiração folicular, nas 31 doadoras, Nelore, pré-púberes, com idade entre 18 a 20 meses, recuperou-se 1348 oócitos, com uma média de 449,33 oócitos por sessão de aspiração e 14,49 oócitos por doadora. Estes achados corroboram com outros trabalhos (Bacelar et al., 2010; Rubin et al., 2004), ao mostrar o potencial de produção de oócitos de fêmeas da raça Nelore.

Diversos fatores podem influenciar na colheita de oócitos durante os procedimentos de OPU e de acordo com Dayan et al. (2000) existe uma grande variabilidade entre idade, doadoras e raças. Os mesmos autores (DAYAN, et al., 1999) em estudo realizado avaliando a influência da condição ovariana na OPU, verificaram outra característica que é a presença de CL. A presença desta estrutura influenciou diretamente no número de oócitos recuperados.

Relativamente, têm-se poucas informações sobre o potencial efeito da idade dos animais doadores no desenvolvimento embrionário subsequente (RIZOS et al., 2005). Os estudos com animais jovens, desperta o interesse dos pesquisadores a décadas. Ericksson, (1966) mostrou que uma das vantagens em trabalhar com animais jovens seria a quantidade de folículos que se desenvolvem serem de melhor qualidade ao comparar com animais púberes.

REVEL et al. (1995), ao compararem o número de oócitos recuperados, habilidade do oócito em ser fertilizado, Clivado, e desenvolver até blastocisto encontraram diferenças ($p < 0,05$) entre bezerras e vacas. Os oócitos oriundos de vacas tiveram taxa de produção de blastócito de 21% vs 9% de bezerras. Mermillod et al. (1992) avaliando o efeito da idade sobre o desenvolvimento de blastocisto após a PIVE, encontraram melhores resultados em doadoras entre 1 e 3 anos de idade do que os animais mais velhos. Relatos ocasionais, no entanto, têm produzido oócitos de qualidade superior provenientes de vacas em vez de novilhas. Galli et al. (2003) estudaram a produção *in vitro* de embriões de um rebanho contendo novilhas e vacas. Os oócitos das vacas resultaram em taxas de clivagem significativamente maiores após a fertilização *in vitro*, e um maior número de embriões transferíveis.

A baixa capacidade de desenvolvimento do oócito em bezerras comparada com vacas cíclicas pode estar relacionado ao ambiente endócrino encontrado *in vivo* antes do início da puberdade (REVEL et al., 1995). Essa redução na competência de oócitos de fêmeas pré-púberes pode ser em parte, atribuído ao menor tamanho do oócito, diferenças na síntese proteica e metabolismo energético, atraso na migração das organelas citoplasmáticas e redução da atividade de algumas enzimas (CAIXETA; DONE, 2010).

Barbosa (2011), aspirando doadoras Nelore múltiparas não gestante, não verificou diferença ($p > 0,05$) no número de oócitos aspirados ao comparar animais sem e com CL (1118 *versus* 1086). Ao final de 250 sessões de aspiração encontrou uma média de 17,17 oócitos aspirados por ovário.

Reis et al. (2006) ao trabalharem com doadoras Holsteiin Friesan de diversas faixas etárias observaram que o número total de oócitos coletados, foi diretamente proporcional ($R = 0,99$; $P < 0,001$) à idade das vacas, variando de $6,00 \pm 1,00$ para fêmeas com idade inferior a 2 anos, a $11,55 \pm 1,52$ para vacas com idades

superiores a 8 anos. As vacas em fase luteínica produziram, em média, $10,87 \pm 1,01$ oócitos, enquanto que as vacas em fase folicular produziram, em média, $7,05 \pm 0,91$ oócitos.

No presente trabalho essa característica não foi confirmada, pois devido á categoria (novilhas) e idade dos animais, os ovários eram de difícil manipulação e o simples fato da presença de CL tornava o procedimento de colheita de oócitos mais difícil, o que resultou em diferenças significativas entre os grupos. Os animais com CL recuperou uma média de $11,16 \pm 9,75$ *versus* $16,07 \pm 11,03$ sem CL.

8.1 Concentrações séricas de progesterona

No presente estudo as concentrações médias de progesterona no grupo controle diferiram ($p < 0,05$) em relação aos grupos tratados. Nos animais pré-púberes e púberes o grupo controle obteve uma média de 2,24 ng/mL e nos grupos P(7) e P(14), 3,37 ng/mL e 3,78 ng/mL, respectivamente. Apesar de não ter diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos tratados pode-se notar picos séricos de P4 no momento (-7), comprovando que a progesterona injetável longa ação na dose de 150 mg/mL permaneceu com níveis séricos de P4 acima de 2 ng/mL por períodos superiores a sete dias nos animais pré-púberes e 5 ng/mL nos animais púberes. Resultados semelhantes foram encontrados por LIMA et al. (2007) estudando o perfil plasmático de P4 em bezerras Nelore e mestiças após o uso de uma fonte de P4 injetável longa ação verificaram que nas dosagens de 450 mg e 750mg, as concentrações de progesterona ficaram acima de 1ng/mL por até treze dias. As bezerras Nelore apresentaram concentração média de progesterona circulante de 2,87 ng/mL, superior à encontrada para bezerras mestiças, de 1,40 ng/mL ($P > 0,05$). Valentin (2004), ao estudar o perfil plasmático de diferentes implantes intravaginais ao encontrar valores de $3,3 \pm 0,7$ ng/mL para implantes com 1,9 g de P4 e $2,6 \pm 2,0$ ng/ml para implantes de 1 g de P4.

Trabalho realizado por Rocha (2011) com vacas Hereford ovariectomizadas avaliando uma fonte de progesterona via subcutânea e intramuscular, na dose de 375 mg e 250 mg, verificou que a via subcutânea na dose de 375 mg, a

concentração sérica de P4 permaneceu acima de 1 ng/mL por até 8 dias. Já quando utilizou dose de 250 mg as concentrações séricas de P4 ficaram acima de 1 ng/ml por apenas 4 dias. De acordo com Whistnant e Burns (2002), novilhas com concentração circulante de progesterona superiores a 1 ng/mL são consideradas cíclicas, pela caracterização da ocorrência da atividade luteal e aquelas com concentrações inferiores a 1 ng/mL, como pré-púberes ou não cíclicas.

Entretanto, segundo Claro Junior (2010), ao avaliar a influencia de P4 exógena em novilhas pré-púberes Nelore, verificou que antes do início dos tratamentos (d-19) 8,6% das novilhas pré-púberes (ausência de CL) apresentavam concentrações séricas de P4 acima de 1,0 ng/mL e que na segunda colheita, sete dias após, houve aumento de animais “falso-positivo”, ou seja, animais sem presença de CL, mas com P4 acima de 1,0 ng/mL. Esses achados foram confirmados por estudos conduzidos por Cooke e Arthington (2008), ao trabalharem com novilhas cruzadas pré-púberes e por Hollestein et al. (2005), ao utilizar vacas zebuínas ovariectomizadas. Os mesmos encontraram concentrações de P4 na ordem de $1,2 \pm 0,15$ ng/mL quando esses animais estavam sob condição de estresse, e atribuíram esses níveis a suprarenal.

Miguez (2005), ao dosar P4 em vacas ovariectomizadas encontrou valores que variaram de 0,11 ng/mL a 1,96 ng/mL. Mais recentemente Maziero et al. (2012) ao avaliarem a influencia do manejo diário ou semanal, ou seja o diferentes níveis de estresse, sobre as concentrações de cortisol e progesterona em fêmeas Nelore, observaram concentrações de até 4,42 ng/mL nas fêmeas manejadas diariamente, e uma correlação positiva entre o cortisol e a progesterona durante as semanas de estudo ($r = 0,9$; $p < 0,05$). O presente estudo utilizou novilhas zebuínas, de temperamento agressivo, difícil manejo, o que pode explicar o porquê das altas concentrações de P4 mesmo nos animais pré-púberes e não tratados.

8.2 Influência da progesterona na quantidade e qualidade oocitária

No contexto da produção *in vitro* de embriões o desenvolvimento e a competência do oócito está na habilidade de maturar, ser fertilizado, e desenvolver até o estágio de blastocisto (DURATHON; RENARD, 2001). E o fator chave na PIVE esta na qualidade do oócito submetido a MIV. Outros fatores que afetam a qualidade do oócito é o estado fisiológico e reprodutivo da doadora, o tamanho do folículo, e a extensão e integridade de revestimento de células do *cumulus* (RIZOS et al., 2005).

Ao final das avaliações não foram verificadas diferenças significativas quanto ao número de oócitos viáveis (G I, II, III), entre os animais que receberam tratamento com progesterona exógena (grupos P7 e P14) em relação aos animais que não receberam progesterona (grupo P0). As médias e desvio padrão das taxas (%) de oócitos viáveis não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos. Os grupos P0, P7, P14 obtiveram uma taxa de (76,34%, 79,62% e 67,93%) de oócitos viáveis.

Santos (2010), avaliando o uso de P4 exógena na qualidade oocitária de novilhas da raça Gir e Girolando no momento da superestimulação, observou que as novilhas superestimuladas na presença de progesterona exógena apresentaram maior número de oócitos recuperados. A raça Gir apresentou superioridade em relação à raça Girolando nas variáveis, taxa de recuperação (76,0 e 67,0) e total de estruturas coletadas (9,7 e 8,3), respectivamente. Quando avaliou o número de estruturas recuperadas (totais) encontrou 14,3 e 7,9 ($p<0,05$), para as raças Gir e Girolando, respectivamente. Comparando as variáveis oocitárias entre novilhas da mesma raça em relação a resposta com e sem progesterona exógena, Santos (2010) verificou diferenças significativas na raça Gir ($P<0,05$) para número de folículo no dia da OPU (15,2 e 19,8) e número de oócitos recuperados (11,0 e 14,3).

Estudo conduzido por Nasser et al. (2011) ao trabalharem com vacas Nelore não encontraram diferença ($p<0,05$) no número de estruturas recuperadas na aspiração folicular, o grupo tratado com P4 recuperou ($23,0 \pm 11,7$) e o controle ($18,0 \pm 13,6$) ($p>0,05$). No ensaio realizado com doadoras Nelore multíparas, Barbosa, (2011) avaliou a PIVE de oócitos oriundos de ovários com e sem CL, e não

foram encontradas diferenças significativas na porcentagem de oócitos viáveis entre os grupos com ou sem P4 endógena.

Reis et al. (2002), trabalhando com novilhas *Bos taurus* ciclando, compararam dois diferentes momentos do ciclo estral para aspiração. No primeiro momento os animais estavam sobre influência de P4 (CL funcional) e o segundo sem influencia de P4. Verificaram diferenças quanto ao número de oócitos coletados ($7,2 \pm 0,47$ vs $5,7 \pm 0,44$) mas não encontraram diferenças ($p > 0,05$) na porcentagem de oócitos viáveis (55% vs 47%).

Vassena et al. (2003) relataram melhor qualidade do oócito após a recuperação no dia 5 do ciclo estral, quando as concentrações de P4 ainda estavam baixas, mas WIT et al. (2000) não verificaram diferenças na qualidade dos oócitos obtidos durante o início da fase lútea, até 7 dias do ciclo estral ou aquelas colhidas entre os dias 8-17 do ciclo. Taneja et al. (2000) avaliando dois diferentes progestágenos (Synchromate-B® e CIDR-G®) em fêmeas holandesas juvenis e pré-púberes não encontraram diferenças ($p < 0,05$) quanto ao desenvolvimento e competência oocitária.

8.3 Influência da progesterona na qualidade e produção embrionária

O desenvolvimento embrionário depende do potencial de crescimento do embrião e da adequação do ambiente uterino em que o embrião se desenvolve o que é, por sua vez, regulado pela adequação da produção de progesterona materna (MANN et al., 2003). Nos bovinos, aproximadamente, 40% das perdas gestacionais ocorrem entre os dias 8 a 16 de gestação. O crescimento e desenvolvimento do concepto requer a ação de P4 no útero para regular a função endometrial, incluindo interações concepto-materna, reconhecimento da gestação, e receptividade uterina para a implantação (LONERGAN et al., 2011).

Na presente pesquisa as médias e desvio padrão das taxas (%) de embriões produzidos não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos dos animais pré-púberes (sem CL.). Os grupos P0, P7, P14 obtiveram taxas de embriões produzidos de 35,56%,

41,92% e 42,59%, respectivamente, com média de $4,04 \pm 4,80$, $5,03 \pm 4,44$ e $4,34 \pm 4,66$ embriões produzidos por sessão de aspiração.

Quando comparado os grupos de animais com e sem CL, não foi verificada diferenças ($p > 0,05$) na produção de embriões entre os grupos. A média de embriões produzidos foi de $4,16 \pm 5,16$ para os animais com CL e $4,74 \pm 4,86$ para os animais sem CL por sessão de aspiração. O fato das doadoras entrarem em puberdade não influenciou na melhora da qualidade oocitária e embrionária.

O uso de animais juvenis e pré-púberes em programas de produção de embriões oferece um considerável potencial de ganho genético e redução entre intervalos de gerações de doadoras de alto mérito genético (LOHUIS, 1995). O desenvolvimento de embriões produzido *in vitro* de doadoras juvenis tem sido variável, alguns achados têm mostrado que a síntese anormal de proteínas e incompleta maturação influenciem negativamente no desenvolvimento e competência do oócito (LE' VESQUE; SIRARD 1994).

Santos (2010), avaliando o uso de P4 exógena na produção de embriões de novilhas zebuínas leiteiras, observaram que as doadoras na presença de progesterona exógena apresentaram maior número de embriões de melhor qualidade. A raça Gir apresentou superioridade em relação à raça Girolando, nas variáveis, qualidade dos embriões, Grau 1 (3,6 e 0,8), Grau 2 (3,3 e 2,4), Grau 3 (1,9 e 1,0), respectivamente. Barbosa (2011) ao analisar a produção de embriões viáveis de ovários sem e com CL de doadoras Nelore, verificou que no geral os ovários com a presença de CL produziram mais que os sem CL (40,93 % vs 31,63%, $p < 0,05$).

Reis et al. (2002), trabalhando com novilhas Simental não gestante, não encontraram diferença na porcentagem na produção de embriões (24 ± 3 vs $26 \pm 4\%$, $p > 0,05$) em doadoras sob influência ou não de P4 endógena, respectivamente. Taneja et al. (2000) avaliando fêmeas holandesas juvenis e pré-púberes quanto ao desenvolvimento e competência oocitária não encontrou diferenças ($p < 0,05$). Os animais dos grupos Synchronate-B® e CIDR-G® produziram ($39,6 \pm 9,1\%$ e $52,3 \pm 14,4\%$) estruturas clivadas e ($3,27$ e $5,56$) embriões produzidos por sessão de aspiração, respectivamente. Chian et al. (2002), não encontraram diferença ($p < 0,05$) na produção de embriões (30,4% com CL vs 26,5% sem CL).

Texeira (2009) ao avaliar diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético curraleiro/ pé-duro encontrou a proporção entre o número de embriões viáveis e totais de 63,6% para o Grupo Controle, 63,8% para P24 (progesterona retirada do protocolo junto com a primeira aplicação de PGF2 α) e 73,3% para P36 (progesterona retirada do protocolo junto com a segunda aplicação de PGF2 α), sugerindo um possível efeito benéfico do maior tempo de exposição à progesterona sobre a qualidade dos embriões produzidos por vacas Curraleiras/Pé-duro, semelhante ao que ocorre com animais taurinos.

Alguns autores têm adicionado P4 ao meio de cultura *in vitro* de embriões, e examinadas desenvolvimento embrionário. Os resultados, no entanto, têm sido variados e contraditórios, algumas pesquisas relatando efeitos positivos (Fukui, 1989), enquanto outras relataram nenhum efeito (Goff; Smith, 1988). Ferguson et al. (2012), ao verificar a influencia da progesterona no desenvolvimento embrionário, observaram que o grupo em que foi acrescentado P4 no meio de cultivo teve uma maior produção de blastocisto (59%) quando comparado ao grupo controle (40%) ($p < 0,05$).

No entanto, a utilização de P4 na CIV tem diminuído significativamente o padrão de produção de blastocisto. Este efeito negativo se acentua, principalmente, quando as células do oviduto não são expostas ao E2. O mesmo estimula as células do oviduto a produzirem glicoproteínas e fatores de crescimento além de receptores de estrógenos e progesterona (REIS et al., 2010). De acordo com Ferguson et al. (2012), as desvantagens encontradas em diversos estudos a respeito do efeito direto da progesterona no desenvolvimento dos embriões tem sido, aparentemente, a adição de P4 em momentos inadequados ou o uso de sistemas de co-cultivo que impedem a detecção dos efeitos diretos da progesterona.

Quanto à taxa de clivagem, quando foi considerada a fase do ciclo estral, observou-se que os COC's provenientes de vacas em fase luteínica apresentaram taxa de clivagem superior aos provenientes de vacas em fase folicular em mais de 15,5%. O fato das vacas que estavam em fase luteínica do ciclo estral, terem uma maior taxa de fecundação e de desenvolvimento dos seus embriões pode dever-se aos ovários possuírem um maior número de folículos pertencentes a várias ondas

foliculares, os quais não sofreram ainda um processo tão acentuado de atresia (REIS et al., 2006).

A influência da P4 na maturação e o seu potencial impacto na qualidade do oócito ainda não está bem definido. No entanto, a presença de receptores de E2 e P4 no fluido de folículos pré-ovulatórios no período entre o pico de LH e ovulação, coincide com a reativação da meiose e maturação do oócito, o que sugere o papel da P4 neste processo. Altas concentrações de P4 após a concepção estão associadas com o aumento do embrião e maior produção de interferon-tau e maiores taxas de gestação em bovinos (BACELAR et al., 2010).

Portanto, o caminho para alcançar concentrações adequadas de progesterona é o principal fator a ser avaliado quando se utiliza a suplementação exógena com P4 (injeção, inserção), pois pode ter efeito prejudicial na vida útil do CL, levando a ciclos curtos e comprometendo a sobrevivência do conceito (O'HARA et al., 2014).

9 CONCLUSÃO

- O uso da progesterona injetável longa ação em novilhas pré-púberes não melhorou a qualidade oocitária e a produção de embriões.
- Os animais com presença de CL apresentaram menor quantidade de estruturas recuperadas.

10 REFERÊNCIAS

- ABIEC (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE). **Rebanho bovino brasileiro**. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 10 ago. 2014.
- ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 100, n. 1, p. 27-33, 1994.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos Taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, New York, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90052-7](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(80)90052-7)>. Acesso em: 10 ago. 2014.
- ALBUQUERQUE, F. T.; FILHO, J. B. B.; VIANA, J. H. M. **Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte**: bases anatômicas fisiológicas e histológicas na reprodução da fêmea. Lavras: Departamento de Medicina Veterinária, 2004.
- ALVES, N. G.; PEREIRA, M. N.; COELHO, R. M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 6, p. 118-124, 2009. Suplemento.
- ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, New York, v. 54, n. 5, p. 1025-31, 1996.
- ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. **The Veterinary Clinics of North America and Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 3, p. 479-492, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.07.008>>. Acesso em: 10 ago. 2014.
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, New York, v. 44, n. 6, p. 871-878, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00272-A](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(95)00272-A)>. Acesso em: 10 ago. 2014.
- BACELAR, D.; MAX, M. C.; PADILHA, L. C.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M. 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, 2010.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSOR, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17-beta, progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 8, p. 1263-1274, 1994.

BARBOSA, C. P. **Produção *in vitro* de embriões de bovinos da nelore oriundos de oócitos de ovários com e sem corpo lúteo**. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2006. p. 113-132.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2004. p. 155.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N.; CREPALDI, G.; SÁ FILHO, M. Inducción de ciclicidad en vaquillonas cebu y sus cruas. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 8., 2009, Córdoba. **Anais...** Córdoba: IRAC, 2009. p. 1-13.

BASSO, V. T.; NASCIMENTO, P. P.; CASTILHO, C. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de fêmeas de abatedouro. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 2, n. 1, p. 12-16, 2006.

BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, J. F.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 7, p. 1173-1179, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.014>>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

BERGMANN, J. A. G.; ZAMBORLINI, L. C.; PROCÓPIO, C. S. O.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 1, p. 69–78, 1996.

BEZERRA, J. E.; ELIAS, D. Difusão do trabalho agrícola formal o Brasil e sua dinâmica multiescalar. **Investigaciones Geográficas**, Alicante, n. 76, p. 104 - 117, 2011.

BINELLI, M.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BERTAN, C. M. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 125-134, 2009.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: BARUSELLI, S. (Org.). **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo, 2000. p. 99-114.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BURNS, P. J.; EVERETT, K. A.; BRINSKO, S. P.; BOEHNKE, L. Regulation of estrous and ovulation in mares with progesterone and estradiol biodegradable microspheres with or without PGF2 α . **Theriogenology**, Philadelphia, v. 38, n. 6, p. 1091-1106, 1992.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and oestradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 193–204, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01389-H](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(95)01389-H)>. Acesso em: 20 Jul. 2014.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 5, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 6, p. 1221-1236, 1997.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 6, p. 1163-1176, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00072-6](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(96)00072-6)>. Acesso em: 15 Jul. 2014.

BURNS, P. J.; STEINER, D. V. M.; SERTICH, P. L.; POZOR, M. A.; TICE, T. R.; MASON, D. W.; LOVE, D. F. Evaluation of biodegradable microspheres for the controlled release of progesterone and estradiol in an ovulation control program for cycling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 13, n. 9, p. 521-524, 1993.

CACHAPUZ, J. M. S. **Experiências com o desmame aos 60 e 90 dias**. Porto Alegre: EMATER, 1997. p. 1-52.

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

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 27, p. 217, 1987. [Abstract]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90094-X](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(87)90094-X)>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G. de P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 20, n. 3, p. 368–75, 2008.

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; AONO, F. H. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, New York, v. 74, n. 6, p. 903–911, 2010.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; MARY, D.; RUTLEDGE, M. D.; MARCELO, F.; MARTINEZ, M. F.; JULIE, A. SMALL, J. A.; REUBEN, J.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2007.

COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; CRUZ, M. H.; GASPAR, R. C.; OLIVEIRA, C. S.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M. Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 7, p. 689-694, 2014.

COOKE, R. F.; ARTHINGTON, J. D. Plasma progesterone concentrations as puberty criteria for Brahman – crossbred heifers. **Journal of Livestock Science**, [S.l.], v. 123, p. 101–105, 2008.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related with oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, n. 2-4, p. 132-142, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.002>>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

CRUZ, F. B.; MARTINS, L. T.; MARINHO, L. S. R.; FABIANA FORELL, F.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A. Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 184-187, 2009.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 45, n. 4, p. 521–534, 1996.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; LÔBO, R. B.; FRANCESCHINI, P. H. WATANABE, Y. F. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças zebuínas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 226, 1999.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FI. **Arquivos da Faculdade Veterinária, UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 181-185, 2000.

DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 1–15, 1998. Supplement 3.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D. D.; SCHANBACHER, B. D.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, New York, v. 31, n. 2, p. 332 – 341, 1984. Disponível em: <[http://dx.doi.org/ 10.1095/biolreprod31.2.332](http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod31.2.332)>. Acesso em: 15 Jun. 2014.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, New York, v. 37, n. 5, p. 1054–1065, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/ 10.1095/biolreprod37.5.1054](http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod37.5.1054)>. Acesso em: 15 Jun. 2014.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 234, n. 1-2, p. 19-25, 2005.

DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 28, n. 3, p. 255-259, 1991.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 77, n. 1, p. 1–36, 1986. Disponível em: <[http://dx.doi.org/ 10.1530/jrf.0.0770001](http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0770001)>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

DOMINGUEZ, M. M. Effects of body condiccion, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 8, p. 1405-1418, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00126-S](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(95)00126-S)>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

DURANTHON, V.; RENARD, J. P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 55, n. 6, p. 1277–89, 2001.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; GONÇALVES, P. E. M.; MARTINS, J. A. M.; LEITE, T. G.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, n. 3, p. 800- 805, 1966.

FERGUSON, C. E.; KESLER, D. J.; GODKE, R. A. Progesterone enhances *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 77, n. 1, p. 108–114, 2012.

FERRELL, C. L. Effects of post-weaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 55, n. 6, p. 1272–1283, 1982.

FIGUEIREDO, A. M.; SANTOS, M. L.; LIMA, J. F. Importância do agronegócio para o crescimento econômico de Brasil e Estados Unidos. **Gestão & Regionalidade**, São Caetano do Sul, v. 28, n. 82, p. 5-17, 2012.

FUKUI, Y. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 1318–23, 1989.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINE, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 55, n. 6, p. 1341-1357, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00486-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00486-1)>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 2, p. 599–616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1-4, p. 371-379, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01530-8](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(96)01530-8)>. Acesso em: 10 Ago. 2014

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocytes recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, New York, v. 50, n. 4, 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. **Anais...** Londrina: UEL, 2004. p. 223-230.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 437–46, 1988.

GOFF, A. K.; SMITH, L. C. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 5, p. 1021–30, 1988.

GOLETIANI, N. V.; KEITH, D. R.; GORSKY, S. J. Progesterone: review of safety for clinical studies. **Experimental Clinical Psychopharmacology**, Washington, v. 15, n. 5, p. 427–444, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CABI International, 1994. 640 p.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

GOTTSCHALL, C. S.; AGUIAR, P. R. L.; ALMEIDA, M. R.; MAGERO, J.; TOLOTTI, F.; BITTENCOURT, H. H.; SUÑÉ, Y. B. P. Utilização da progesterona, injetável ou impregnada em dispositivo intravaginal, na indução da ciclicidade de novilhas previamente a estação de acasalamento. **Veterinária em Foco**, Canos, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2011.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWENG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.

HESS, B. W. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas. Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 6., 2002, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC, 2002. p. 118 –126.

HOLLENSTEIN, K.; JANETT, F.; BLEUL, U.; HASSIG, M.; KAHN, W.; THUN, R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 93, n. 3-4, p. 292–302, 2005.

HOLM, D. E.; THOMPSON, P. N.; IRONS, P. C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1934–1940, 2009.

HORVATH, T. L. A GABA-neuropeptide Y (NPY) interplay in LH release. **Peptides**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 473-481, 2001.

IEL (INSTITUTO EUVALDO LODI); SEBRAE; CAN (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE AGRICULTURA). **Estudo sobre a eficiência econômica e competitividade da cadeia agroindustrial da pecuária de corte no Brasil**. Brasília, DF, 2000. Disponível em <[http://www.cna.org.br/PublicacoesCNA/EstudosdasCadeiasProdutivas/Pecuaria de corte](http://www.cna.org.br/PublicacoesCNA/EstudosdasCadeiasProdutivas/Pecuaria%20de%20corte)>. Acesso em: 17 ago 2014.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 451-460, 1984.

KESLER, D. J.; FAVERO, R. J.; TROXEL, T. R. Comparison of hidron and silicone implants in the bovine norgestimate and estradiol valerate synchronization procedure. **Drug Development Industry Pharmacy**, New York, v. 21, p. 475-485, 1995.

KHATIR, H.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 267-275, 1997.

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MEMILLOD, P. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocytes developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 45, n. 2, p. 231-239, 1996.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1424-1440, 1996.

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOCK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 34, p. 167-186, 1987.

KUWER, A.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Developmental capacity of cumulus oocyte complexes collected from prepubertal cattle with and without gonadotropin stimulation employing ultrasound-guided follicular aspiration. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 1, p. 323, 1999.

LAMMERS, B. P.; HEINRICHS, A. J.; KENSINGER, R. S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 82, n. 8, p. 1753-1764, 1999.

LANNA, D. P. Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: [s.n.], 2004. p. 41-78.

LANSBERGEN, L. M. T. E.; VAN, W.; LEEUW, A. M.; DAAS, J. H. G.; RUIG, L.; VANDER STREEK, G.; REINDERS, J. M. C.; AARTS, M.; RODEWIJK, J. Factors affecting ovum pick-up in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 43 n. 1, p. 259, 1995.

LEONARDI, C. E. P.; PFEIFER, L. F. M.; RUBINA, M. I. B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R. J.; PESSOA, G. A.; BAINY, A. M.; SILVA, C. A. M. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 7, p. 1578–1582, 2012.

LE VESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 34, n. 2, p. 133–139, 1994.

LIM, K. T.; JANG, G.; KO, K. H.; LEE, W. W.; PARK, H. J.; KIM, J. J.; LEE, S. H.; HWANG, W. S.; LEE, B. C.; KANG, S. K. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 2, p. 293-302, 2007.

LIMA, F. P. C.; MARQUES JUNIOR, A. P.; DOUGLAS, R. H.; NETO, M. H. Concentração sérica de progesterona em bezerras da raça nelore e mestiças tratadas com progesterona em veículo de liberação lenta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 600-604, 2007.

LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, Philadelphía, v. 43, n. 1, p. 51–60, 1995.

LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S.; FERRAZ, P. A.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 93-101, 2014.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 9, p. 1594–1601, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012>>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, New York, v. 65, p. 137–152, 2006.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

MACHADO, R.; SILVA, J. C. B.; BARBOSA, R. T.; BISINOTTO, R. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; BINELLI, M. Remoção farmacológica ou mecânica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 344, 2006. Suplemento 1.

MANN, G. E.; GREEN, M. P.; SINCLAIR, K. D.; DEMMERS, K. J.; FRAY, M. D.; GUTIERREZ, C. G.; GARNSWORTHY, P. C.; R. WEBB, R. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, n. 1-2, p. 71-79, 2003.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, Chicago, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA). **Bovinos e bubalinos**. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

MARTIN, L. C.; BRINKS, J. S.; BOURDON, R. M. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 4006-4017, 1992.

MATTOS, S.; ROSA, A. N. Desempenho reprodutivo de fêmeas de raças zebuínas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 112, p. 29-33, 1984.

MAZIERO, R. D.; MARTIN, I.; MATTOS, M. C. C.; FERREIRA, J. C. P. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 3, p. 366-372, 2012.

McDONALD, L. E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2003. 597 p.

MERMILLOD, P.; MASSIP, W. C.; DESSY, F. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 96, n. 2, p. 717-723, 1992.

MIGUEZ, P. H. P. **Cinética de liberação de progesterona a partir de blendas com PCL (Poli-e-caprolactona) + PHB (Poli-hidroxibutirato)**. 2005. 100 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MONTEIRO, F. M. **Puberdade em novilhas nelore provenientes de duas linhas de seleção para peso**. 2011. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária-Reprodução Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p. 1291-1301, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00483-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00483-6)>. Acesso em: 09 Ago. 2014.

NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Produção e metabolismo da progesterona e seu papel antes, durante e depois da inseminação artificial influenciando a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 41, p. 1130, 2013.

NASSER, L. F.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; REZENDE, C. R.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 2, p. 320-327, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.009>>. Acesso em: 09 Ago 2014.

NOGUEIRA, G. P.; DE LUCIA, R. F. S.; PEREIRA, F. V.; CIRILO, P. D. Precocious fertility in Nelore heifers. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 68, p. 382, 2003. Supplement 1.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South América *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 361–372, 2004.

O'HARA, L.; FORDE, N.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: Can supplementary progesterone rescue small embryos? **Theriogenology**, New York, v. 81, n. 8, p. 1123–1128, 2014.

OJEDA, S. R.; NEGRO-VILAR, A.; McCANN, S. M. Evidence for involvement of α -adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin E2 and luteinizing hormone-releasing hormone release from the median eminence. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 110, n. 2, p. 409-412, 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/endo-110-2-409>>. Acesso em: 09 Ago. 2014.

OLIVEIRA, D. J. C. **Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas da raça Nelore**. 2006. 189 f. Tese (Doutorado Reprodução animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PARR, B. M. H.; CROWEB, M. A.; LONERGAN, P.; EVANSC, A. C. O.; RIZOSD, D.; DISKINA, M. G. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein–Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 7–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.008>>. Acesso em: 10 Ago. 2014

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either *swim-up* or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, New York, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PATEL, O. V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J.; COUSSENS, P. M.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor development competence of bovine oocytes. **Reproduction**, Chicago, v. 133, n. 1, p. 95-106, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.01123>>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 5, p. 703–708, 2002.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. **Theriogenology**, New York, v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.

PRESICCE, G. A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C. R.; GODKE, R. A. YANG, X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology Reproduction**, New York, v. 56, n. 2, p. 386-392, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod56.2.386>>. Acesso em: 09 Ago. 2014.

PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 49, n. 1, p. 85-91, 2014.

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J. R. G.; BINELLI, M. Fertility response in suckled beef cows supplemented with long-acting progesterone after timed artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 27, n. 1, p. 93-270, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/RDv27n1Ab11>>. Acesso em: 08 Ago. 2014.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, New York, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H)>. Acesso em: 08 Ago. 2014.

QUADROS, S. A. F. de; LOBATO, J. F. P. Bioestimulação e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 3, p. 679-683, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982004000300016>>. Acesso em: 08 Ago. 2014.

QUINTANS, G.; STRAUMANN, J. M.; AYALA, W.; VASQUEZ, A. I. Effect of winter management on the onset of puberty in beef heifers under grazing conditions. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. 2004. Porto Seguro, 2004.

RAMOS, A. F.; RUMPF, R.; CAMARA, J. U.; MOLLO, M. R.; PIVATO, I.; MARQUES, J. R. A.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, n. 3-4, p. 201-220, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.009>>. Acesso em: 09 Ago. 2014.

RATHBONE, M. J.; MACMILLAN, K. L.; INSKEEP, K.; SHANE, B.; BUNT, C. R. Fertility regulation in cattle. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 117-148, 1998.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 14 dez. 2014.

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; SILVA, F. M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de oócitos e de embriões produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962006000500007>>. Acesso em: 06 Set. 2014.

REIS, A. N.; SILVA, L. K. X.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Efeito do estradiol e da progesterona no desenvolvimento e na qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1375-1380, 2010.

REIS, A.; STAINES, M. E.; WATT, R. G.; DOLMAN, D. F.; McEVOY, T. G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 137-151, 2002.

RESTLE, J.; POLLI, V. A.; SENNA, D. B. efeito de grupo genético e heterose sobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 701-707, 1999.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 115-120, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1030115>>. Acesso em: 06 Set. 2014.

RIZOS, D.; BURKEA, L.; DUFFYA, P.; WADEA, M.; MEEB, J. F.; O'FARRELLB, K. J.; MACSIURTAINC, M.; BOLANDA, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 3, p. 939–949, 2005.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPUOLOS, S.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Developmental, quality and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 62, n. 3, p. 320-327, 2002.

ROCHA, D. C. **Utilização de progesterona injetável de longa ação no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas de corte**. 2011. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

RODRIGUES, A. D. P.; PERES, R. F. G.; LEMES, A. P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 1, p. 135–141, 2013.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRIK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at differing ages. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, n. 3, p. 603-609, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.3.603>>. Acesso em: 06 Set. 2014.

RUBIN, K. C. P.; RIGO, A. G.; SCHROEDER, R. V.; SILVA, R. C. P.; MARQUES, M. O.; SENEDA, M. M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 121, 2004.

RUBIN, K. C. P. **Particularidades reprodutivas da raça nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE)**. 2006. 64 f. Monografia (Especialização em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SANTOS, K. J. G. **Efeito da progesterona exógena na produção de embriões em novilhas gir e girolando** 2010. f. 124. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SANTOS, R. M. **Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas Holandesas não-lactantes na progesterona plasmática e na produção de prostaglandina pelo endométrio**. 2005. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

(SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES). Mudanças de tendências no Mercado de embriões bovinos no Brasil. **Jornal o Embrião**, Jaboticabal, v. 42, p. 5-7, 2009.

SCHILLO, K. K.; HALL, J. B.; HILEMAN, S. M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3994-4005, 1992.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 3, p. 835–843, 2001.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R. Technical and biological aspects on recovery of oocytes from cattle donors: bibliographical review. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 36, n. 1-2, p. 61-75, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90054-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(94)90054-X)>. Acesso em: 06 Set. 2014.

SHORT, R. Y.; STAIMILLER, R. B.; BELLOWS, R. L. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. In: FIELDS, M. J.; SAND, R. S. (Ed.). **Factors affecting calf crop**. London: CRC Press, 1994. p. 55-68.

SILVA, C. C.; KNIGHT, P. G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Journal of Reproductions and Fertility**, Hoboken, v. 119, n. 2, p. 261-269, 2000. Disponível em: <10.1530/jrf.0.1190261>. Acesso em: 06 Set. 2014.

SNEL OLIVEIRA, M. V. R.; PEREIRA, D. C.; JUNIOR, D. M.; RUMPF, R. Estimulação Hormonal, Punção Folicular Transvaginal e Avaliação Ovocitária em Bezerras Pré-Púberes da Raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 1, p. 106-114, 2003.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, A. B.; IVÁNCICS, J.; BARANYAI, B.; GÓCZA, E.; KOVÁCS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 285-290, 2002.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, New York, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>>. Acesso em: 06 Set. 2014.

SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; SILVA, M. A.; REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 24, n. 6, p. 926–935, 1995.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 562-569, 2002.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.

TEIXEIRA, H. C. A. **Diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético curraleiro/pé-duro**. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.

TORRES-JÚNIOR, J. R. de; MELO, W. O.; ELIAS, A. K. S.; RODRIGUES, L. S.; PENTEADO, L.; BARUSELLI, P. S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 53-58, 2009.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **Livestock and poultry: world markets and trade**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 20 maio 2014.

VALENTIM, R. **Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados em inseminação artificial em tempo fixo**. 2004, 88 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y. K.; PEELMAN, L. J.; DE MATOS, D. G.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 5, p. 1453-1518, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00726-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00726-9)>. Acesso em: 06 Set. 2014.

VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO, O. G.; SILVA, A. T. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus × Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n. 2-4, p. 302–311. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.012>>. Acesso em: 06 Set. 2014.

VASSENA, R.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; PIERSON, R. A.; SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 25–41, 2003.

VIANNA, G. N. O.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; SEGUI, M. S.; MEIRELLES, C.; EFING, A. C.; BREDA, J. C.; GIACOMELLI, A. Comparação de diferentes protocolos para a sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo em vacas da raça nelore em anestro pós-parto. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 13, n. 4, p. 247-254, 2008.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 915-924, 2007. Suplemento 3.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, p. 661-674, 2010. Suplemento 2.

WHISNANT, C. S.; BURNS, P. J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 6, p. 1229-1235, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00942-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00942-1)>. Acesso em: 15 Out. 2014.

WILTBANK, J. N.; GONZALES-PADILLA. Synchronization and induction of estrus in heifers with a progestagen and estrogen. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Lês Ulis, v. 15, n. 2, p. 255, 1975. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/rnd:19750212>>. Acesso em: 15 Out. 2014.

WILTBANK, J. N.; KASSON, C. W.; INGALLS, J. E. Puberty in crossbred and straight bred beef heifers on two levels of feed. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 29, p. 602-605, 1969.

WIT, A. A.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1277-1283, 2000.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckledbeef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 1, p. 25–55, 2000. Disponível em: [http://dx.doio.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00323-X](http://dx.doio.org/10.1016/S0093-691X(00)00323-X). Acesso em: 15 Ago. 2014.

APÊNDICES

Apêndice 1:

Meio maturação dos oócitos: O meio base utilizado para a MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 26mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 1,0µg/mL de FSH (Calier, Juatuba, Brasil), 50µg/mL de hCG (Serono, Aubonne, Suíça), 1,0µg/mL de Estradiol 17β, 0,20mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Como fonte protéica na Maturação foi utilizado 10% de SFB (Crypion, Andradina, Brasil).

Apêndice 2:

Meio TL-Sêmen: O meio TL-Sêmen é composto por 100mM de CLoreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de CLoreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,4mM de CLoreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de CLoreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26mM de DL-Ácido Lático (60%), 30µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino) e 10mM de Hepes Ácido.

Apêndice 3:

Meio FIV gotas: O meio FIV gotas é composto por TL-Stock [114mM de CLoreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de CLoreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5mM de CLoreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt, 83 Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de CLoreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de DL Ácido Lático (60%) e 30µM de *Phenol Red* (Sal Sódico

Cristalino)], 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), PHE [29,4mM de DL-Ácido Lático (60%)], 1,0µg/ml de Bissulfito de Sódio, Salina 0,9% e 2mM de D-Penicilamina], 176UI/mg de Heparina e 6mg/mL de BSA (FIV).

Apêndice 4:

Solução de Percoll: A solução de Percoll 90% é composta por 31mM de CLoreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3mM de Dihidrofosfato de Sódio monohidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 800mM de CLoreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 50mM de Hepes Ácido , 50mM de Hepes Sódico, 1,0M de CLoreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 100mM de CLoreto de Magnésio hexa-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26,4mM de DL-Ácido Lático (60%) e 20mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA).

Apêndice 5

Meio SOFaa: O meio SOFaa é composto por 1,1M de CLoreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 72mM de CLoreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7,4mM de Sulfato de Magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 50µM de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 260µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino), 178mM de CLoreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não- Essenciais 100x, 2,8mM de Myo-Inositol, 340µM de Tri-Citrato de Sódio Di- Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 5mg/ml de BSA (CIV) e 2,5% de SFB.