

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

QUADRO 1. Distribuição das doadoras nos grupos de acordo com a fase experimental. Pg 19.

FIGURA 1. Cronologia e protocolos experimentais dos Grupos D3, D5, D7 e D9. Pg 20.

FIGURA 2. Cronologia e protocolos experimentais dos grupos D4 e D8. Pg 27.

FIGURA 3. Fotomicrografias de oócitos bovinos MIV por 24h – Progressão nuclear, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) oócito não maturo (VG); (b) oócito maturo (VGBD) (metáfase II). Azul: os oócitos foram corados com Hoechst 33342. Pg 29

FIGURA 4. Fotomicrografias de oócitos bovinos MIV por 24h – Distribuição dos grânulos corticais, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) GC em transição, dispostos em todo o citoplasma, no centro e na periferia (oócito em transição imaturo/maturo); (c) GC dispostos na periferia (oócito maturo). Verde: os oócitos foram corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a FITC. Pg 29.

TABELA 1. Número total de folículos (≥ 2 mm) visualizados na ultra-sonografia, estruturas totais recuperadas, taxa de recuperação, oócitos viáveis grau I, II, III, desnudo) e taxa de viáveis nos grupos D3, D5, D7 e D9 (n=10 vacas Nelore por grupo).Pg 24.

TABELA 2 Número total de oócitos viáveis, distribuídos de acordo com o grau de qualidade, GI , GII, GIII e desnudo (D) nos grupos D3, D5, D7 e D9 (n = 10 vacas Nelore).Pg 25.

TABELA 3. Número total de oócitos viáveis, número total de estruturas clivadas, taxa de clivagem 32 a 36 horas após a FIV, número total blastocistos e taxa de blastocistos dos grupos D3, D5, D7 e D9 (n=10 vacas Nelore por grupo). Os blastocistos foram avaliados nos dias 7 e 8 após a FIV (DIA 0). Pg 25.

TABELA 4. Número total de oócitos, taxa de maturação nuclear e citoplasmática nos grupos D4 e D8. (n=6 vacas Nelore por grupo).Pg 30.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFD = Aspiração do folículo dominante
b = Espécie bovina
BE = Benzoato de estradiol
BSA = Albumina sérica bovina
CE = Ciclo estral
CIV = cultivo *in vitro*
CL = Corpo lúteo
COCs = Complexo cumulus-oócitos
e = Espécie eqüina
E₂ = Estradiol 17 β
eCG = Gonadotrofina coriônica eqüina.
FD = Folículo dominante
FIV = Fecundação *in vitro*
FSH = Hormônio folículo estimulante
GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas
h = Espécie humana
hCG = Gonadotrofina coriônica humana
hMG = Gonadotrofina da menopausa humana
IGF-1 = Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IM = Via intramuscular
KG = kilogramas
L = Litro
LH = Hormônio luteinizante
mg = Miligramas
MHz = Mega hertz
MIV = Maturação *in vitro*
ml = Mililitros
mm = Milímetros
mM = Miliosmol
mmHg = Milímetros de mercúrio
NaCl = Cloreto de sódio

o = Espécie ovina

OPU =(ovum pick-up)-punção folicular

p = Espécie porcina

PBS = Tampão fosfato salina

PIV =Produção in Vitro de embriões

P₄ = Progesterona

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

SFB = Soro fetal bovino

SOF = sintetic oviduct fluid

TCM = tissue culture media

TE = Transferência de embrião

UI = Unidade internacional

US = Ultra-som ou ultra-sonografia

μ L = micro-litro

μ g = micro-grama

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 CICLO ESTRAL.....	9
2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR.....	10
2.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIV).....	12
3. EXPERIMENTO 1.....	17
3.1. OBJETIVOS.....	16
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.2.1.Doadoras.....	18
3.2.2.Grupos Experimentais.....	18
3.2.3. Aspiração folicular para obtenção de oócitos.....	21
3.2.4. Transporte, lavagem e seleção de oócitos.....	21
3.2.5. Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	22
3.2.6. Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	22
3.2.7. Cultivo <i>in vitro</i> dos prováveis zigotos.....	23
3.2.8. Análise Estatística.....	23
3.3 RESULTADOS.....	24
4. EXPERIMENTO 2.....	26
4.1.OBJETIVOS.....	26
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26

4.2.1. Doadoras.....	26
4.2.2. Grupos Experimentais.....	26
4.2.3. Aspiração folicular, transporte, lavagem, seleção e maturação in vitro dos oócitos.....	27
4.2.4. Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática.....	27
4.2.5. Análise Estatística.....	29
4.3. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

Experimento 1- O objetivo foi avaliar, em vacas Nelore, a influência da fase da onda folicular na qualidade e quantidade dos oócitos recuperados, através da OPU (ovum pick-up), assim como a produção de blastocistos. Todos os animais (n=10) receberam em dia aleatório do ciclo estral um implante auricular de progestágeno (Crestar®) e uma aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®) com o objetivo de sincronizar a onda folicular. Após sete dias o implante foi retirado e foi aplicada uma dose de 2ml de um análogo da PGF2 α (Preloban®). Após de 24 hs as doadoras foram submetidas à aspiração do folículo dominante (AFD) sendo então este momento considerado dia 0. Após a AFD, as doadoras foram submetidos a OPU nos dias 3, 5, 7, e 9 (Grupo **D3, D5, D7 e D9**) da nova onda folicular. Foram realizadas quatro fases (Fase 1, 2, 3 e 4) onde os animais foram trocados de grupo a cada fase, de forma que cada animal foi submetido aos quatro tratamentos. A cada fase o protocolo era iniciado com dois dias de intervalo entre um grupo e outro, iniciando pelo grupo **D9** e na seqüência os grupos **D7, D5, D3**, desta forma todas as doadoras foram aspiradas no mesmo dia, porém com a onda folicular em dias diferentes. O objetivo deste delineamento foi para que as aspirações fossem efetuadas no mesmo dia, de forma que os oócitos recuperados fossem maturados, fertilizados e cultivados in vitro numa mesma sessão de PIV. Duas hipóteses foram testadas: 1- O número de oócitos viáveis recuperados seria maior na fase inicial da onda folicular (dia 3) ou logo após a divergência folicular (dia 5) do que obtidos em períodos mais tardios da fase de dominância (dias 7 e 9). 2- Os oócitos aspirados no início da onda folicular (dia 3 ou 5) teriam melhor competência e produziram maior número de blastocistos do que oócitos obtidos no final da onda (dias 7 e 9), pois estes estariam num grau de atresia avançado. Não houve diferença no número total de folículos (≥ 2 mm) visualizados na ultra-sonografia no momento da aspiração nos grupos **D3, D5, D7 D9** (195, 189, 161, 151, respectivamente) assim como na taxa de recuperação (77,94%; 78,30%; 72,04%; 73,50% respectivamente) e número de estruturas totais recuperadas (152, 148, 116, 111 respectivamente). Não houve diferença no número total de oócitos viáveis (133, 137, 103, 97) e na taxa de clivagem dos oócitos nos 4 grupos (79,69%; 83,45%; 71,84%; 76,28% respectivamente). O número total e taxa de produção de blastocistos foi maior nos grupos D3 e D5 (66/49%, 62/45,25%) do que nos grupos D7 e D9 (34/33%, 35/36,08%). **Experimento 2-** O objetivo foi avaliar em vacas Nelore a influência da fase da onda folicular induzida na taxa de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos recuperados no início (D4) e final da onda folicular (D8). A hipótese testada foi, de que oócitos quando recuperados no início da onda (Dia 4) teriam melhor competência e apresentariam melhor taxa de maturação nuclear e citoplasmática in vitro do que oócitos aspirados no final da onda folicular (dia 8) da onda de vacas Nelore. Foram selecionadas a seis doadoras do experimento 1 que tiveram melhor número de oócitos viáveis recuperados e foram submetidas ao mesmo protocolo experimental do experimento 1, porém as aspirações foram realizadas do dia 4 (grupo D4) na primeira etapa deste experimento, e numa etapa subsequente as mesmas vacas foram aspiradas no dia 8 (Grupo D8). Os oócitos aspirados foram maturados por 24 horas e corados com Hoechst 33342 para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática. Não houve diferença estatística no número total de oócitos viáveis recuperados para os grupos D4 e D8 (78 vs 97). A taxa de maturação nuclear e citoplasmática apesar de não diferir estatisticamente, foi mais elevada no grupo D4 em relação D8. Maturação nuclear, 74,35 % vs 53,6 % respectivamente e maturação citoplasmática, 48,71% vs 30,92% respectivamente. Com o resultado destes experimentos, concluímos que o início da onda (dia 3 ao dia 5) seria o momento mais adequado para a obtenção de oócitos destinados a PIV devido a maior competência oocitária e conseqüentemente maior número e taxa de produção de blastocistos.

Palavras chave: produção in vitro, competência oocitária, atresia oocitária, onda folicular, aspiração folicular.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate in Nelore cows the influence of the moment of the follicular wave in the quality and amount of the recovered oocytes, through the OPU, (ovum pick-up), as well as the production of blastocysts. All the animals (n=10) received in random day of the estrous cycle an auricular progestogen implant (Crestar®) and was administered of 2mg of estradiol benzoate (Estrogin®) with the objective of synchronizing the follicular wave. After seven days the implant was removed and a dose of 2ml of an analogous of PGF2 was administrated (Preloban®). After 24 hours the donors were submitted later of the dominant follicle aspiration (DFA) being then this moment considered day 0. After DFA the donors were submitted to OPU after on the 3, 5, 7, and 9 days (Groups D3, D5, D7 and D9) of the new follicular wave. Four sessions were accomplished (sessions 1, 2, 3 and 4) where the animals were changed from group to each phase, so that each animal it was submitted to the four treatments. To each phase the protocol was begun with two days of interval among a group and other, beginning for the group **D9** and in the sequence the groups **D7, D5, D3**, this way all of the donors were aspirated in the same day, however with the follicular wave in different days. The objective of this outline was so that the aspirations were made in the same day, so that the recovered oocytes they went matured, fertilized and development *in vitro* in a same session of IVP. Two hypotheses were tested: 1 - the number of recovered viable oocytes would be larger numerical in the initial phase of the wave follicular (day 3) or soon after the follicular divergence (day 5) of those obtained in later periods of the dominancy phase (days 7 and 9). 2 - The oocytes aspirated in the beginning of the follicular wave (day 3 or 5) they would be better competent and they would produce larger number of blastocysts than oocytes obtained in the end of the wave (days 7 and 9), because these would be in a degree of advanced atresia. There was not difference in the total number of follicles (≥ 2 mm) visualized in the ultrasound scan in the moment of the aspiration in the groups **D3, D5, D7 D9** (195, 189, 161, 151, respectively) as well as in the recovery rate (77.94%; 78.30%; 72.04%; 73.50% respectively) and number of recovered total structures (152, 148, 116, 111 respectively). There was not difference in the total number of viable oocytes (133, 137, 103, and 97) and in cleavage rate of the oocytes in the 4 groups (79,69%; 83.45%; 71.84%; 76.28% respectively). The total number and the blastocysts production rates were larger in the groups D3 and D4 (66/49%, 62/45,25%) than in the groups D7 and D9 (34/33%, 35/36,08%). **Experiment 2-** The objective was evaluate in Nelore donors the influence of the follicular wave phase induced in nuclear and cytoplasmic maturation rate in oocytes obtained in the beginning (D4) and at the end of the follicular wave (D8). The hypothesis tested was that the oocytes when recovered in the beginning of the wave (Day 4) presents the best competence and presented the best nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation rates when compared with oocytes recovered at the end of the follicular wave (day 8) in Nelore donors. Six donors were selected in the experiment 1, and after produced the best number of viable oocytes that recovered and were submitted in the same experimental protocol in the experiment 1, however the aspirations were realized in day 4 (group 4) in the first stage at this experiment, and in subsequent stage the same donors were aspirated in day 8 (Group D8). The aspirated oocytes were matured in 24 hours and ruddy in Hoechst 33342 to evaluate the nuclear and cytoplasmic maturation. There was not statistic difference in the total number of viable oocytes recovered into the groups D4 and D8 (78 vs. 97). The nuclear and cytoplasmic rates in spite of not differed statistically, was more elevate in the group D4 in comparison with the group D8. Nuclear maturation, 74,35% vs. 53,6% respectively and cytoplasmic maturation, 48,71% vs. 30,92% respectively. With these experiments results is possible to conclude that the beginning of the wave (day 3 at day 5) was the moment more appropriate to obtain oocytes designated to IVP proper the better oocyte competence, and consequently better number and blastocyst production rate.

Key words: *in vitro* production, oocyte competence, oocyte atresia, follicular wave, follicular aspiration.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária Brasileira vem crescendo e se consolidando como uma das mais importantes do mundo, e tem se destacado principalmente pela exportação da carne bovina e seus derivados, desempenhando portanto, papel fundamental na economia nacional.

Os animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido a sua maior adaptação aos climas quentes, maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (*Bos taurus taurus*). Hoje, estima-se que o Brasil possui um rebanho com mais de 165 milhões de bovinos de corte e leite criados a pasto, dos quais 80% do gado de corte é Nelore ou anelorado, o que equivale a mais de 100 milhões de cabeças (Associação dos Criadores de Nelore do Brasil - ACNB, 2007).

A Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) é uma biotécnica da reprodução que tem sido muito estudada e utilizada para o melhoramento genético do rebanho nacional. O interesse pela técnica de PIV tem crescido nos últimos anos, pois este procedimento permite a recuperação de oócitos colhidos de doadoras por meio da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (*Ovum Pick-up*, OPU) e produção de embriões de alto valor genético, podendo ser realizado uma ou duas vezes por semana sem alterações aparentes no trato reprodutivo, independente da fase do ciclo estral (KRUIP *et al.*, 1994; PIETERSE *et al.*, 1991; BOLS *et al.*, 1995). Uma das vantagens da PIV frente a tradicional técnica de Transferência de Embriões (TE) é que na PIV não é necessário o uso de hormônios para promover a superovulação (SOV), pois nestes tratamentos tem se observado alta variabilidade individual das doadoras, levando a inconstantes respostas superestimulatórias ovarianas, limitando os resultados e o uso da TE.

Na PIV também existe variabilidade individual na produção de embriões e de gestações. Vários fatores podem afetar a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* até a fase de blastocistos, que permanece em torno de 30% do total de oócitos submetidos a maturação. De 8 a 10 oócitos colhidos pela OPU há uma produção média de 2 embriões transferidos em bovinos de raças européias (GALLI *et al.*, 2000). Em animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) DAYAN *et al.*, (2000) observaram grande variação na taxa de blastocisto entre as doadoras, com média

de 42% de embriões produzidos *in vitro*. A capacidade para fecundação e desenvolvimento de oócitos maturados *in vivo* é maior que os oócitos maturados *in vitro* (BLONDIN *et al.*, 2002). O momento da obtenção dos oócitos durante a onda folicular é importante para determinar a qualidade do oócito (SIRARD *et al.*, 1999).

O crescimento do oócito dentro do folículo ovariano é determinado por grande número de fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*. Estes fatores incluem: tamanho folicular (LONERGAN *et al.*, 1994; HENDRIKSEN *et al.*, 2000), dia do ciclo estral (MACHATKOVÁ *et al.*, 1996), nível de atresia e influência do folículo dominante (HAGEMANN, 1999).

Na OPU os oócitos colhidos para a produção *in vitro* são obtidos em fases aleatórias do ciclo estral, portanto em diferentes etapas do desenvolvimento folicular sendo 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). Quando a aspiração folicular é realizada em fase aleatória do ciclo estral mais de 85% dos folículos ovarianos são atrésicos, portanto a fase folicular pode determinar a qualidade do oócito (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CICLO ESTRAL

Em fêmeas bovinas o intervalo entre dois cios ou estros consecutivos é denominado ciclo estral. Nas raças européias (*Bos taurus taurus*) o comprimento do ciclo estral é de $21 \pm 3,7$ dias para vacas e $20 \pm 2,3$ dias para novilhas (WRIGHT & MALMO, 1992), enquanto que em raças indianas (*Bos taurus indicus*) varia de 17 a 24 dias (MUKASA-MUGERWA, 1989, GALINA & ARTHUR, 1990, PINHEIRO et al., 1998).

O ciclo estral pode ser didaticamente dividido em duas fases principais: folicular e luteal. A fase folicular tem início após a luteólise induzida pela prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) com conseqüente queda nos níveis séricos de progesterona (<1 ng/ml) entre 12 e 36 horas após o início da luteólise, seja ela natural ou induzida por $PGF2\alpha$ exógena (DIELEMAN et al., 1986).

O aumento da freqüência de pulsos de LH estimula o desenvolvimento do folículo dominante que secreta quantidades crescentes de estradiol ($E2$) induzindo o comportamento estral ou cio (MUKASA-MUGERWA, 1989, CLARKE, 1988).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem, além do comportamento estral, o pico pré-ovulatório de LH (através de retroalimentação positiva no hipotálamo e hipófise) e conseqüentemente a ovulação e formação do corpo lúteo (CL). A presença do CL caracteriza a fase lútea do ciclo estral. Nesta fase, o CL produz progesterona em quantidades crescentes a partir da ovulação até o 10º dia do ciclo estral onde a secreção se mantém estável até que ocorra a luteólise, entre o 15º e o 20º dia (LUQUE et al., 1983, HAFEZ, 1993).

O cio é o período caracterizado pela receptividade sexual, onde a fêmea permite ser montada (BLOCKY, 1980, ESSLEMONT et al., 1980). Em fêmeas *Bos taurus taurus* o cio dura cerca de 16 a 18 horas (ESCOBEDO et al., 1989, GALINA & ARTHUR, 1990, STOCK & FORTUNE, 1993). Por outro lado, em zebuínos, a receptividade sexual é, em média, de apenas 11 horas (MUKASA-MUGERWA, 1989; GALINA & ARTHUR, 1990; PINHEIRO et al., 1998) podendo variar de 1,3 a 20 horas (MUKASA-MUGERWA, 1989, GALINA & ARTHUR, 1990). Em raças européias o intervalo entre o início do estro a ovulação é de 28 a 30 horas

(ESCOBEDO et al., 1989; GALINA & ARTHUR, 1990, STOCK & FORTUNE, 1993) e cerca de 25 a 29 horas em zebuínos (BARROS et al., 1994, CAVALIERI et al., 1997, PINHEIRO et al., 1998). Não foi observada diferença no intervalo estro-ovulação entre vacas da raça Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*) ($26,1 \pm 6,3$ h versus $27,1 \pm 3,3$ h), porém a duração do cio foi 3,4 h mais curta no Nelore do que no Angus (12,9 h vs 16,3 h, MIZUTA, 2003).

2.2. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Na década de oitenta, com a utilização da ultra-sonografia, a dinâmica folicular ovariana em bovinos foi melhor compreendida, propiciando um novo impulso para o estudo do controle farmacológico do ciclo estral bovino.

O ciclo estral é caracterizado pela ocorrência de ondas de crescimento folicular. Cada onda dura cerca de 8 a 10 dias e é dependente da duração do corpo lúteo durante o ciclo estral, (SAVIO et al., 1988, SIROIS & FORTUNE, 1988, ROCHE & BOLAND, 1991, FORTUNE et al., 1993).

A maioria das fêmeas bovinas apresenta duas ondas (PIERSON & GINTHER, 1988, KNOPFT et al., 1989, GINTHER et al., 1989) ou três (IRELAND & ROCHE, 1987, SAVIO et al., 1988, SIROIS & FORTUNE, 1988) de crescimento folicular e ocasionalmente uma ou quatro ondas (SAVIO et al., 1988, SIROIS & FORTUNE, 1988, MURPHY et al., 1990).

Durante cada onda, um grupo de folículos antrais (3 a 5 mm), responsivos as gonadotrofinas, são estimulados a crescer. Um folículo dominante emerge deste grupo e passa a secretar quantidades crescentes de estradiol 17β , inibina e outros fatores (STOCK & FORTUNE, 1993, SUNDERLAND et al., 1994, BODENSTEINER et al., 1996a,b, GINTHER et al., 1996, 1997b, EVANS et al., 1997, WOLFSDORF et al., 1997), os quais levam à regressão e atresia dos folículos subordinados (KO et al., 1991, ADAMS et al., 1993a,b, SMITH et al., 1996).

GINTHER et al. (1997a) utilizaram o termo desvio folicular para definir o momento em que se nota pela primeira vez uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos ovarianos, ou seja, a divergência folicular é caracterizada pelo crescimento contínuo do futuro folículo dominante e redução ou parada de crescimento do segundo maior folículo.

O mecanismo de desvio deve ser capaz de impedir o crescimento de futuros folículos subordinados, porque tanto eles quanto o futuro folículo dominante, são capazes de exercer dominância, como indicam estudos envolvendo a ablação de folículos (GINTHER, 2000). A administração de FSH no início da onda folicular ou de anti-soro contra inibina impede ou atrasa o desvio folicular, como indica o desenvolvimento de mais de um folículo dominante após estes tratamentos (GINTHER, 2000).

GINTHER et al. (1997a), postularam que uma pequena diferença no diâmetro dos dois maiores folículos no final da fase de crescimento (início do desvio) seria suficiente para permitir o estabelecimento de dominância pelo maior folículo antes que o segundo maior folículo pudesse atingir um diâmetro similar. Apesar da simplicidade desta afirmação, os mecanismos, através dos qual esta vantagem de tamanho é utilizada para estabelecer o desvio folicular, são bastante complexos.

Em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) o desvio folicular ocorre ao redor do segundo dia após a ovulação. Ocasão em que o futuro folículo dominante atinge cerca de 8,5 mm (GINTHER et al., 1996 e 1997a). Em vacas e novilhas da raça Nelore o desvio folicular ocorre quando o folículo dominante atinge aproximadamente 6,0 a 7,2 mm, entre o segundo e o quarto dia após a ovulação (SARTORELLI et al., 2005, CASTILHO, 2007).

A progesterona produzida pelo corpo lúteo, impede o pico pré-ovulatório de LH, o folículo dominante permanece funcional por alguns dias após atingir seu tamanho máximo, e então, sofre atresia. A perda da funcionalidade do folículo dominante resulta em um aumento transitório de FSH plasmático, o qual estimula a emergência de uma nova onda folicular (ADAMS et al., 1992, GIBBONS et al., 1997, GINTHER et al., 1996, 1997a, MIHM et al., 1997). Aproximadamente 20 a 30 folículos emergem em cada onda folicular, e boa parte destes folículos tem o potencial de atingir o estágio pré-ovulatório, fato que pode ser demonstrado pela possibilidade de se estimular o crescimento e a ovulação de vários folículos através da administração de gonadotrofinas (ADAMS, 1994).

Cada onda folicular é composta por uma fase de recrutamento, no qual um grupo de folículos primordiais e primários inicia seu crescimento. Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia (fase de seleção) e potencialmente pode chegar a ovular. O folículo selecionado passa a exercer dominância (fase de dominância) sobre os demais folículos, suprimindo via sistêmica (endócrina) o

crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (GINTHER *et al.*, 1989, GINTHER *et al.*, 1996;; SIROIS & FORTUNE, 1990, ADAMS, 2008).

A seleção do folículo dominante capaz de ovular dentro de um grupo de folículos antrais é um processo dinâmico regulado por interações entre gonadotrofinas, fatores de crescimento e substâncias intra-ovarianas (YUAN *et al.*, 1998. AUSTIN *et al.*, 2001), resultando em uma fase de transição crítica para o desenvolvimento folicular.

2.3 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIV)

A indústria de produção bovina tem mostrado, nos últimos anos, grande interesse no uso de novas biotecnologias da reprodução, tendo em vista o melhoramento genético do rebanho. Uma técnica que tem sido muito utilizada recentemente é a aspiração folicular trans-vaginal guiada por ultra-sonografia, também chamada *Ovum Pick Up* (OPU) e posterior fecundação *in vitro* (FIV), uma vez associadas estas técnicas são de grande interesse na reprodução e melhoramento genético bovino. A aspiração folicular guiada por ultra-sonografia é comumente empregado na recuperação de oócitos imaturos dos folículos ovarianos de animais vivos e tem um potencial para substituir os procedimentos convencionais de superovulação (SOV) utilizados na tradicional técnica de transferência de embriões (TE.; KRUIP *et al.*, 1994).

Desde o nascimento do primeiro bezerro oriundo de fecundação *in vitro* (BRACKET *et al.*, 1982), os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* foram aprimorados tornando esta técnica viável em programas de melhoramento. Apesar dos avanços obtidos com a OPU seguida da FIV nos últimos 10 anos, o uso desta técnica ainda é baixo na indústria de produção de embriões bovinos. Foi estimado que somente 6% dos embriões transferidos na Europa em 1996 foram produzidos *in vitro*, dos quais somente metade era proveniente de doadoras vivas (HEYMAN, 1997). Entretanto, atualmente em torno de 41,97 % dos embriões produzidos no mundo são oriundos da técnica de PIV, na América do Norte esta taxa é de 45%, sendo maior ainda na América do Sul (principalmente Brasil) e Ásia (China e Coreia principalmente) representando 48.6% e 47,9 % respectivamente (Thibier, 2006)

No Brasil em 1994 nasceu o primeiro bezerro da raça Nelore após FIV (PEIXER *et al.*, 1994) e, a partir de então, esta técnica passou a ser estudada e aplicada comercialmente por vários laboratórios.

A OPU permite a repetida recuperação de oócitos de animais vivos sem injúrias aparente ao trato reprodutivo, permitindo, desta forma, a produção de embriões oriundos de vacas com problemas reprodutivos adquiridos (LOONEY *et al.*, 1994; HASLER *et al.*, 1995; RODRIGUES & GARCIA, 2000), durante o primeiro trimestre de gestação (BUNGARTZ *et al.*, 1995; MEINTJES *et al.*, 1995) ou em novilhas pré-púberes (ARMSTRONG *et al.*, 1994; BROGLIATTI & ADAMS, 1996).

Devido a dinâmica folicular em novilhas ou vacas zebuínas e européias ser caracterizada pela presença de duas ou três ondas de desenvolvimento folicular, é possível realizar a recuperação de oócitos por via trans-vaginal durante todo o ciclo estral, mesmo repetidamente (KRUIP *et al.*, 1994; PIETERSE *et al.*, 1991; BOLS *et al.*, 1995; BUNGARTZ *et al.*, 1995). Os protocolos têm geralmente consistido de uma ou duas aspirações semanais usando animais superestimulados ou não (LOONEY *et al.*, 1994; BOLS *et al.*, 1995; BUNGARTZ *et al.*, 1995; HASLER *et al.*, 1995; STUBBINGS & WALTON, 1995).

A eficácia do sistema de produção de embriões *in vitro* é dependente da qualidade da maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Quando os oócitos são removidos de seus folículos e cultivados *in vitro*, a maturação meiótica ocorre espontaneamente, entretanto, a capacidade de desenvolvimento após a fecundação é limitada e, apesar dos progressos feitos nas condições de maturação e desenvolvimento embrionário, somente em torno de um terço (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. Além disso, a taxa de recuperação de oócitos associada à aspiração folicular trans-vaginal, tem-se mostrado variável entre os laboratórios e as vacas doadoras (PIETERSE *et al.*, 1988; BORDIGNON *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 2002). O sucesso na taxa de aspiração folicular pode ser mensurado, em parte, pelo número de oócitos imaturos recuperados de animais superestimulados ou não, em relação ao número de folículos presentes no momento da colheita e por fatores que afetam a eficiência da colheita (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998).

Para otimizar a utilização da OPU, em termos de número e qualidade dos complexos *cumulus* oócitos (COC's) recuperados e a capacidade para o

desenvolvimento *in vitro*, é necessário melhor conhecimento da fisiologia ovariana e seu controle endócrino. O crescimento do oócito dentro do folículo ovariano é determinado por um grande número de fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*.

A influência do tamanho folicular na competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro* foi observada quando verificaram aumento significativo na produção de embriões oriundos de oócitos aspirados de folículos com mais de 6 mm de diâmetro (LONERGAN *et al.*, 1994). PAVLOK *et al.*, (1992), também observaram melhor desempenho na produção de blastocistos quando oócitos de folículos médios (2-4 mm) e grandes (4-8 mm) foram utilizados em comparação a oócitos de folículos pequenos (1-2 mm). HENDRIKSEN *et al.*, (2000) concluíram que a competência para o desenvolvimento *in vitro* é maior para oócitos oriundos de folículos maiores que 6-8 mm quando comparado com folículos de 3-6 mm. No entanto, CAROLAN *et al.* (1996) não observaram influência do tamanho folicular sobre a maturação do oócito. Resultado similar foi obtido por SENEDA *et al.*, (2001) avaliando oócitos oriundos de folículos pequenos (<4 mm) e grandes (>4 mm) aspirados *in vivo*.

Com relação ao estágio do desenvolvimento folicular, MACHATKOVÁ *et al.*, (1996) demonstraram que oócitos colhidos nos dias 14 a 16 do ciclo estral apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento embrionário quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9. Em revisão, HAGEMANN, (1999) concluiu que o desenvolvimento até blastocisto foi significativamente maior em oócitos colhidos durante a fase de crescimento folicular independente do diâmetro do folículo, porém a competência oocitária tendeu a aumentar em oócitos oriundos de folículos maiores.

Alguns autores demonstraram que a realização da OPU nos dias 2 ou 3 da nova onda folicular (próximos da divergência folicular) proporcionaram uma baixa produção de blastocistos possivelmente devido a uma menor competência oocitária e que o melhor momento para aspiração seria no dia 5 (VASSENA *et al.*, 2003), entretanto em trabalhos mais recentes não houve diferença na produção de blastocistos quando se recuperou os oócitos nos dias 2, 3 ou 5 (HENDRIKSEN *et al.*, 2004, MACHATKOVÁ *et al.*, 2004) somente em fases mais avançadas do período de dominância, dias 7 ou 8, houve uma queda na produção concluindo que neste período o estágio avançado de atresia compromete a competência oocitária nos

folículos subordinados (VASSENA et al., 2003, MACHATKOVÁ et al., 2004, HENDRIKSEN et al. 2000, 2004).

Menores taxas de recuperação e de blastocisto são observadas quando a OPU é realizada semanalmente em comparação com OPU a cada 3-4 dias (GOODHAND et al., 1999). Possivelmente a alta frequência nas aspirações previna o estabelecimento do folículo dominante (HENDRIKSEN et al., 2000).

STOCK & SMITH, (1996) utilizaram COC's de folículos grandes para maturar oócitos aspirados de folículos pequenos e observaram que a taxa de blastocisto foi semelhante às obtidas de oócitos de folículos grandes (6-9 mm), demonstrando que fatores parácrinos secretados pelo oócito e/ou células do *cumulus* durante a maturação final são importantes para o desenvolvimento pós-clivagem.

CHAUBAL et al.,(2007), propuseram a utilização de tratamentos hormonais para aumentar a taxa de recuperação e a qualidade de oócitos, estes tratamentos se baseiam na associação de progesterona, aplicação de FSH exógeno para crescimento folicular, e uso de um pico de LH exógeno seis horas antes da aspiração folicular para induzir a maturação oocitária *in vivo*.

Os oócitos colhidos para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em diversas fases do ciclo estral, sendo então expostos a variadas concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH. Estes fatores podem afetar a competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro* (WIT et al., 2000).

Portanto, os oócitos devem ser recuperados numa fase específica ciclo estral, num momento da onda folicular em que o ovário possua uma maior quantidade de folículos e estes possuam tamanho adequado para serem aspirados, além disso, é de fundamental importância que os oócitos contidos nestes folículos possuam competência para serem fertilizados e se desenvolvam até blastocistos.

3. EXPERIMENTO 1

3.1 OBJETIVOS

Avaliar em vacas Nelore a influência do momento da onda folicular na quantidade e qualidade dos oócitos aspirados, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*, e determinar qual o período mais adequado para obtenção de oócitos, por meio da aspiração folicular, destinados à produção *in vitro* de embriões. Duas hipóteses serão testadas:

1. O número de oócitos viáveis recuperados de vacas Nelore seria maior na fase inicial da onda folicular (dia 3) ou logo após a divergência folicular (dia 5) do que obtidos em períodos mais tardios da fase de dominância (dias 7 e 9).
2. Os oócitos aspirados na fase inicial da onda folicular (dia 3) ou logo após a divergência folicular (dia 5) teriam melhor competência oocitária e produziram mais blastocistos do que oócitos obtidos em períodos mais tardios da fase de dominância (dias 7 e 9), pois provavelmente estes estariam num grau de atresia avançado.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 DOADORAS

Este experimento foi realizado na UNESP- Campus de Jaboticabal (latitude -21, 25472, longitude -48,32222) no período de junho a outubro de 2007. Os animais foram mantidos nos piquetes do setor de Bovinocultura de Corte do Colégio Agrícola, mantidos semi-confinados e tratados com silagem de milho.

Vacas não lactantes, múltíparas, da raça Nelore com escore corporal entre 2,5 e 3,0 (numa escala de 0 a 5, LOWMAM et al, 1976), com peso médio de 384 Kg, tiveram seu sistema reprodutivo avaliados através da ultra-sonografia. Somente os animais não gestantes e sem alterações uterinas e ovarianas foram utilizados (n=10). Estas doadoras nunca foram submetidas à OPU anteriormente, e nem sofreram qualquer tipo de controle farmacológico do ciclo estral, tanto para sincronização do estro ou da ovulação assim como tratamentos superovulatórios. Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e/ou recrutamento folicular.

3.2.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

As doadoras foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais denominados **D3**, **D5**, **D7** e **D9**.

Para a pré-sincronização todos os animais receberam em dia aleatório do ciclo estral um implante auricular novo (sem uso) de progestágeno (Crestar[®], Intervet International B.V-Boxmeer-Holanda) e uma aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol, via IM (Estrogin[®], Biofarm Química e Farmacêutica) com o objetivo de sincronizar a onda folicular. O implante de progesterona foi mantido por sete dias para impedir um pico pré-ovulatório de LH e conseqüentemente ovulação do folículo dominante durante os tratamentos. No momento da retirada do implante de progestágeno foi aplicada uma dose de 150 µg de um análogo da PGF2 α (Preloban[®] , d-cloprostenol sódico, via IM, Intervet

International -Holanda) com o objetivo de promover a luteólise de um possível corpo lúteo presente.

Cerca de 24 hs após a retirada do progestágeno e aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, as doadoras foram submetidas à aspiração do folículo dominante (AFD) com o objetivo de induzir a emergência de uma nova onda folicular, sendo então este momento considerado como Dia 0. Após a AFD as doadoras foram submetidos a OPU nos dias 3, 5, 7, e 9 (Grupo **D3**, **D5**, **D7** **D9**) da nova onda folicular.

Com o objetivo de evitar que a variabilidade individual pudesse influir nos resultados do experimento, foram realizadas quatro fases (Fase 1, 2, 3 e 4) onde os animais foram trocados de grupo a cada fase, de forma que cada animal foi submetido aos quatro tratamentos experimentais (**D3**, **D5**, **D7** e **D9**; TABELA 1).

QUADRO 1. Distribuição das doadoras nos grupos de acordo com a fase experimental.

ANIMAIS	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Nº 1,2,	D9	D3	D5	D7
Nº 4,5,6	D7	D9	D3	D5
Nº 7,8,	D5	D7	D9	D3
Nº 10,22,23	D3	D5	D7	D9

D3=Aspiração folicular no dia 3.

D5=Aspiração folicular no dia 5.

D7=Aspiração folicular no dia 7.

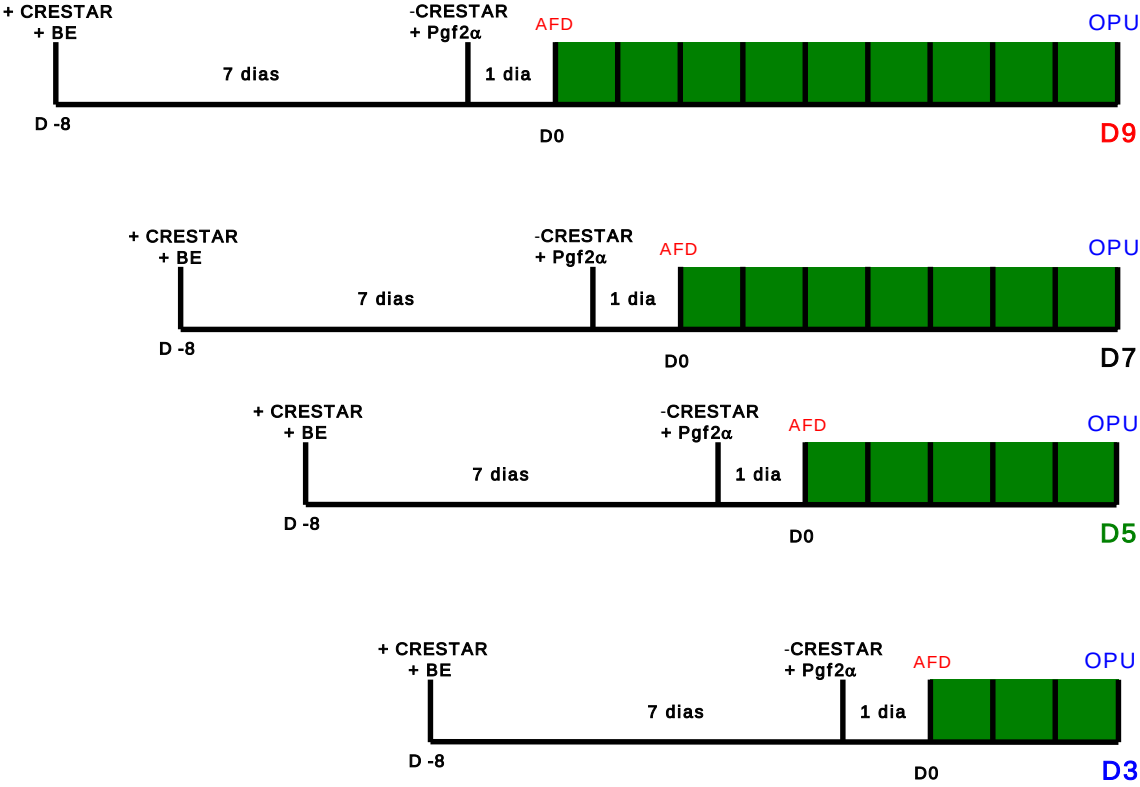
D9=Aspiração folicular no dia 9.

O protocolo experimental foi iniciado com dois dias de intervalo entre um grupo e outro, iniciando pelo grupo **D9** e na seqüência os grupos **D7**, **D5**, **D3**.

Este procedimento foi realizado, para que todas as doadoras fossem aspiradas no mesmo dia, desta forma foram submetidos às mesmas condições, já que alguma possível alteração na PIV influenciaria da mesma forma todos os grupos. Para melhor visualização de cada fase segue o cronograma do experimento na Figura 1.

O intervalo entre as OPUs foram de no mínimo 24 dias permitindo assim o restabelecimento da atividade ovariana, evitando que as repetidas aspirações (fase 1, 2, 3 e 4) prejudicassem o índice de recuperação de oócitos assim como a sua qualidade ao longo do experimento.

FIGURA 1. Cronologia e protocolos experimentais dos grupos D3, D5, D7 e D9.



3.2.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR PARA OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultra-som ALOKA SSD 900, com transdutor micro-convexo 5 MHZ, acoplado em uma guia de aspiração trans-vaginal. As aspirações foram realizadas com agulha hipodérmica descartáveis 40 X 9 (20G, Becton Dickson) e sistema de aspiração Handle e Cook adaptado a dupla via de aspiração. Foi utilizada uma bomba de vácuo da marca Rocket Medical, e a pressão de vácuo/vazão foram ajustadas previamente em 14 mL de água/minuto) a cada fase do experimento.

Antes de cada OPU foi realizada anestesia epidural com 3-4 ml de cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet,, Bravet, Brasil) associado a 1 ml de acepromazina 1% (Acepran, Univet , Brasil). Após a higienização da região perineal com água e álcool 70%, a guia de aspiração acoplada com o transdutor do US era inserida até o fundo de vagina, com auxílio de manipulação trans-retal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visualização no monitor do US. Os folículos a serem aspirados foram quantificados para posterior avaliação da taxa de recuperação de oócitos. Logo após os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultra-som e a bomba de vácuo era acionada iniciando as aspirações dos folículos. Este procedimento foi realizado em todos os folículos acima de 2 mm visualizados em cada ovário. O meio de aspiração e lavagem do sistema é composto de PBS, e heparina sódica (10.000 UI/L).

3.2.4. TRANSPORTE , LAVAGEM E SELEÇÃO DOS OÓCITOS.

O material aspirado foi imediatamente transportado para o laboratório de PIV do departamento de Reprodução Animal da Unesp - Campus de Jaboticabal. Para a lavagem do líquido aspirado foi utilizado filtro de colheita de embriões. O líquido aspirado foi lavado com o mesmo meio utilizado para a aspiração até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. Este sedimento restante foi depositado em placas de Petri para procura e seleção dos oócitos. Posteriormente foi efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos recuperados em Grau I, II, III, IV e desnudo, segundo De Loos et al. (1991), onde:

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

- b) Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: cumulus expandido com células escuras e em grumos, e complexo cumulus-oócito escuro e irregular;
- e) Desnudo: sem camadas do cumulus e com ooplasma uniforme ou com granulações.

3.2.5. MATURAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS

Os oócitos de GI, GII, GIII, e desnudos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado com SFB (Crypion®; 10% SFB), e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/ml de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/ml de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/ml de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

3.2.6. FECUNDAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS

Foram utilizadas palhetas de sêmen de uma única partida, de um mesmo touro Nelore (B 8963 - Lagoa da Serra) com histórico conhecido na PIV.

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em gotas de 100µL de meio TALP-FIV [meio TALP com 30µg/ml de heparina (Sigma H-3149), 18µM de penicilamina (Sigma P 4875), 10µM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8µM de epinefrina (Sigma E-4250)], suplementado com 0,2mM de piruvato, 83,4µg/mL de amicacina e suplementado com 6mg/ml de BSA, cobertas com óleo mineral.

O sêmen, congelado em palhetas de 0,25 ml, foi aquecido em água a 35°C por 30 segundos e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a 900 g por 30 minutos, em meio TALP-sêmen [meio TALP com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)].

Foram recuperados 30 µl do sedimento, que foram avaliados quanto à concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25 x

10^6 espermatozoides móveis/mL com meio TALP-FIV sob óleo mineral. Posteriormente, 8 µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo de 20 a 25 oócitos, obtendo-se a concentração final de 2×10^5 espermatozoides vivos/gota (2×10^6 mL), resultando em $8-10 \times 10^3$ de espermatozoides por oócito. O período de co-incubação foi de 18 a 20h, em incubadora à temperatura de 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

3.2.7. CULTIVO *IN VITRO* (CIV) DOS PROVÁVEIS ZIGOTOS.

Após o término da incubação com os espermatozoides, os prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento em placas de 4 poços Nunc®, com 500 µl de meio SOF, cobertos com óleo mineral, atmosfera de 5% de CO₂ em ar, sob umidade saturada e mantida no interior de incubadora de cultivo à temperatura de 38,5°C, durante 7 a 8 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação).

A taxa de clivagem foi avaliada aproximadamente entre 32 a 36 horas após a fecundação *in vitro* (hpi), em microscópio estereoscópico (aumento de 50 X) e embriões de duas e quatro células foram considerados clivados. No sétimo e oitavo dia após a fecundação *in vitro*, foi avaliada a taxa de desenvolvimento até os estádios de blastocisto.

3.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados obtidos neste experimento foi utilizado o teste do Qui-quadrado, sendo a probabilidade com nível de significância 5% ($P < 0,05$) usando tabela de contingência. Para o cálculo do desvio padrão e média as variáveis foram analisadas pelo programa General Linear System (GLS) do SAS sem transformação prévia das mesmas

3.3. RESULTADOS

Os grupos D3, D5, D7 e D9, não diferiram entre si com relação ao número de folículos (≥ 2 mm) visualizados através da ultra-sonografia (195, 189, 161, 151, respectivamente, tabela 1), também não houve diferença no número de estruturas recuperadas (152, 148, 116, 111, respectivamente), e nem na taxa de recuperação (77,94%; 78,30%; 72,04%; 73,50% respectivamente, tabela 1).

Também não houve diferença estatística entre o número de oócitos viáveis provenientes dos 4 grupos (133, 137, 103, 97, respectivamente, tabela 1) assim como na qualidade dos oócitos viáveis distribuídos de acordo com o grau de qualidade (Tabela 2). O número de estruturas clivadas também não diferiu entre os grupos (106, 114, 74, 74, respectivamente tabela 3). Com relação ao número total de blastocistos os grupos D3 e D5 não diferiram entre si (66 vs 62), porém foram superiores ($P \leq 0,05$) aos grupos D7 e D9 (34 vs 35 tabela 3).

TABELA 1. Número total de folículos (≥ 2 mm) visualizados na ultra-sonografia, estruturas totais recuperadas, taxa de recuperação, oócitos viáveis grau I, II, III, desnudo) e taxa de viáveis nos grupos D3, D5, D7 e D9 (n=10 vacas Nelore por grupo).

	Grupo D3	Grupo D5	Grupo D7	Grupo D9
NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS (MÉDIA $\pm$ DP)	195 (19,5 $\pm$ 7,87)	189 (18,9 $\pm$ 10,76)	161 (16,1 $\pm$ 8,14)	151 (15,1 $\pm$ 6,17)
ESTRUTURAS TOTAIS RECUPERADAS (MÉDIA $\pm$ DP)	152 (15,2 $\pm$ 6,72)	148 (14,8 $\pm$ 9,35)	116 (11,7 $\pm$ 6,66) ^a	111 (11,1 $\pm$ 5,64) ^a
TAXA DE RECUPERAÇÃO (%)	77,94 %	78,30%	72,04%	73,5%
OÓCITOS VIÁVEIS (MÉDIA $\pm$ DP)	133 (13,3 $\pm$ 6,23)	137 (13,7 $\pm$ 8,73)	103 (10,3 $\pm$ 5,88)	97 (9,7 $\pm$ 5,22)
TAXA DE VIÁVEIS (%)	87,5%	92,56%	88,03%	87,38%

Na mesma linha, valores não diferem pelo teste do Qui-quadrado com nível 5% ($p < 0,05$). DP=desvio padrão.

TABELA 2 Número total de oócitos viáveis, distribuídos de acordo com o grau de qualidade, GI, GII, GIII e desnudo (D) nos grupos D3, D5, D7 e D9 (n = 10 vacas Nelore).

GRUPOS	GI	II	GIII	D	Total
D3	44 (33,08%)	24 (18,04%)	46 (34,58%)	19 (14,28%)	133 (100%)
D5	32 (23,35%)	41 (29,92)	47 (34,30)	17 (12,40%)	137 (100%)
D7	26 (25,24%)	24 (23,30%)	26 (25,24%)	27 (26,21%)	103 (100%)
D9	21 (21,64%)	20 (20,61%)	38 (39,17%)	18 (18,55%)	97 (100%)

Na mesma linha, valores diferem, com nível de significância 5% ($p < 0,05$).

TABELA 3. Número total de oócitos viáveis, número total de estruturas clivadas, taxa de clivagem 32 a 36 horas após a FIV, número total blastocistos e taxa de blastocistos dos grupos D3, D5, D7 e D9 (n=10 vacas Nelore por grupo). Os blastocistos foram avaliados nos dias 7 e 8 após a FIV (DIA 0).

	Grupo D3	Grupo D5	Grupo D7	Grupo D9
OÓCITOS VIÁVEIS (MÉDIA±DP)	133 (13,3±6,23)	137 (13,7±8,73)	103 (10,3±5,88)	97 (9,7±5,22)
ESTRUTURAS CLIVADAS (MÉDIA±DP)	106 (10,6±)	114 (11,4±)	74 (7,4±)	74 (7,4±)
BLASTOCISTOS (MÉDIA±DP)	66 ^a (6,6±4,4) ^a	62 ^a (6,2±3,39) ^a	34 ^b (3,4±3,47) ^b	35 ^b (3,5±3,86) ^b
TAXA DE BLASTOCISTOS (%)	49,62% ^a	45,25% ^a	33.00% ^b	36,08% ^b

Na mesma linha, valores com letras diferentes pelo teste do Qui-quadrado com nível 5% ($p < 0,05$).
DP=desvio padrão.

4. EXPERIMENTO 2

4.1 OBJETIVOS

O experimento 2 foi desenvolvido com base nos resultados obtidos no experimento 1. Apesar de não haver diferença no número total de oócitos viáveis e taxa de clivagem nos 4 grupos (experimento 1) houve uma maior produção de blastocistos produzidos nos grupos aspirados no início da onda (grupos D3 e D5) do que no final da onda (D7 e D9).

Baseados nestas observações, este experimento foi delineado com objetivo avaliar em vacas Nelore a influência do momento da onda folicular induzida na taxa de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos recuperados no início (D4) e final da onda folicular induzida (D8). Foi testada a seguinte hipótese:

1. Oócitos quando recuperados no início da onda (Dia 4) teriam melhor competência, portanto apresentariam melhor taxa de maturação nuclear e citoplasmática in vitro do que oócitos aspirados no final da onda folicular (dia 8) da onda induzida de vacas Nelore.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

.

4.2.1. DOADORAS

Foram selecionadas seis doadoras (n=6) que tiveram maior número de oócitos viáveis recuperados durante o experimento 1. Estas doadoras foram submetidas neste experimento às mesmas condições descritas no experimento 1.

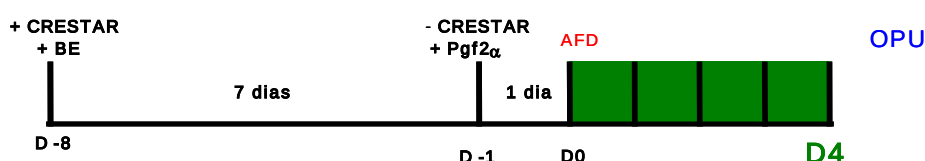
4.2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As doadoras foram submetidas ao mesmo protocolo hormonal do experimento 1, porém as aspirações na primeira etapa foram realizadas em todas doadoras no

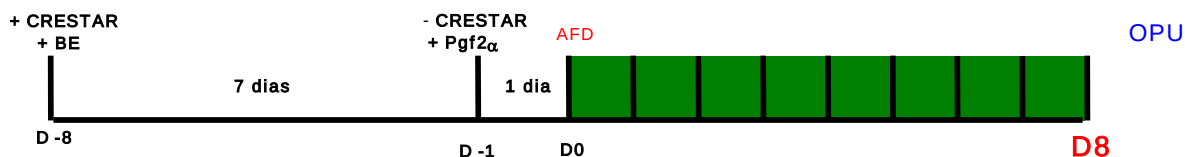
dia 4 (grupo D4, dia intermediário entre D3 e D5, já que não houve diferença entre estes no experimento 1). Na etapa subsequente, as mesmas vacas foram aspiradas no dia 8 (Grupo D8, dia intermediário entre D7 e D9, figura 2). O intervalo entre as aspirações foi de 21 dias.

FIGURA 2. Cronologia e protocolos experimentais dos grupos D4 e D8.

Grupo D4



Grupo D8



4.2.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR, TRANSPORTE, LAVAGEM, SELEÇÃO E MATURAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS.

Após os tratamentos hormonais, os procedimentos utilizados, desde a obtenção dos oócitos até a maturação in vitro, foram os mesmos descritos no experimento 1.

4.2.4. AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA.

Após maturação por 24h, foi realizada a remoção das células do cumulus com 0,2% de hialuronidase (Hyalozima®, Aspen) em PBS livre de Ca²⁺, com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136), e remoção da zona pelúcida com pronase

(0,5% em PBS) por 3 minutos e depois em solução ácida (PBS pH 2,5) por 10 segundos, à temperatura ambiente. Posteriormente, os oócitos foram fixados em 3% de formaldeído (Mallinckrodt 5016), em PBS, por 30 minutos à temperatura ambiente, e incubados a 4°C durante a noite, em solução de bloqueio – SB [PBS com 1mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), 100mM de glicina (Plusone 17-1323-01) e 0,2% de azida de sódio (Sigma S-2002)].

Para a permeabilização, foram tratados por 15 minutos a 38°C em SB acrescida de 0,1% de Triton X-100 (USB 22686). Posteriormente, foram incubados em 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA); esta lecitina se liga especificamente à α -D-manose presente nos grânulos corticais. Em seguida, os oócitos foram lavados em SB 3 vezes, corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em SB por 10 minutos, lavados novamente em SB, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão). Em cada grupo experimental os oócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear pela progressão nuclear (excitação 330-385nm e emissão 420-490nm para o Hoechst) e para avaliação quanto à maturação citoplasmática pela distribuição dos grânulos corticais (filtro FITC: excitação 460-490nm e emissão 515nm, para o isotiocianato de fluoresceína).

Os oócitos foram classificados quanto à maturação nuclear através do estágio de progressão nuclear, e foram considerados maduros os oócitos no estágio de Metáfase II (M II), Figura 3. Quanto à maturação citoplasmática, foram classificados quanto à distribuição dos grânulos corticais (GC), foram considerados imaturos os oócitos com GC arranjados em “clusters” distribuídos por todo o citoplasma; os oócitos com GC migrando para a periferia foram considerados parcialmente maduros ou transição e somente os oócitos com GC dispostos na periferia de forma homogênea foram considerados maduros; de acordo com a classificação de HOSOE e SHIOYA (1996) e MÉO (2002), Figura 4.

FIGURA 3.

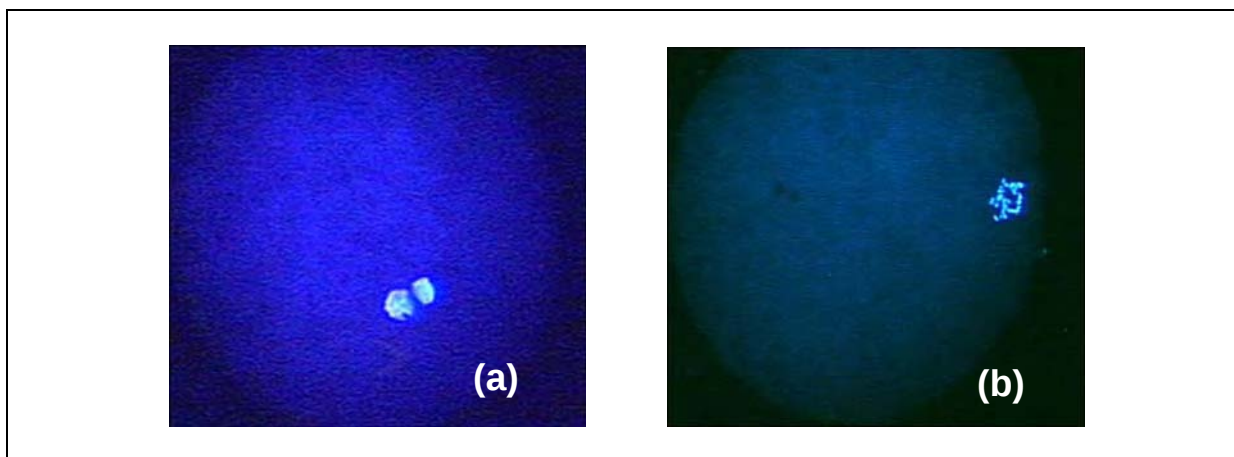


FIGURA 3. Fotomicrografias de oócitos bovinos MIV por 24h – Progressão nuclear, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) oócito não maturo (VG); (b) oócito maturo (VGBD) (metáfase II). Azul: os oócitos foram corados com Hoechst 33342.

FIGURA 4.

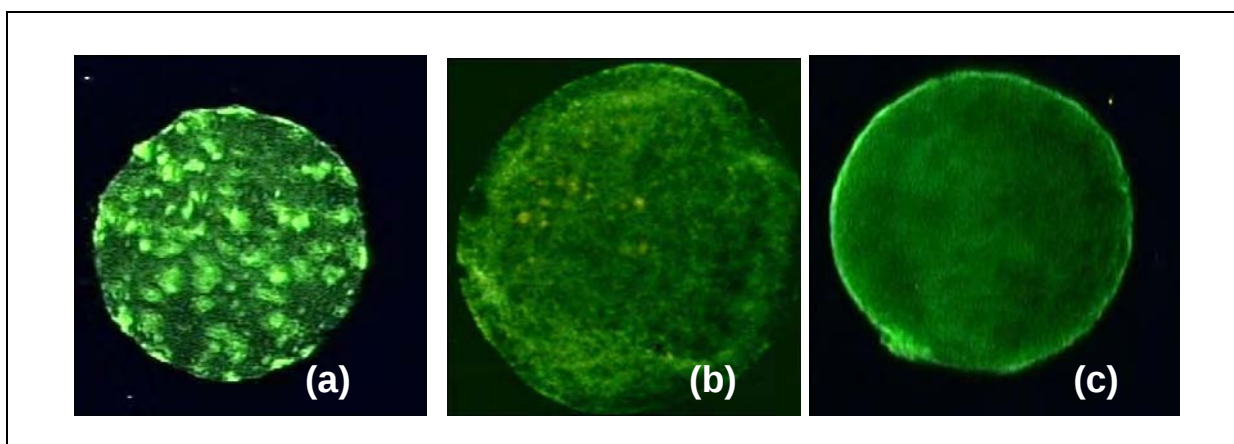


FIGURA 4. Fotomicrografias de oócitos bovinos MIV por 24h – Distribuição dos grânulos corticais, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) GC em transição, dispostos em todo o citoplasma, no centro e na periferia (oócito em transição imaturo/maturo); (c) GC dispostos na periferia (oócito maturo). Verde: os oócitos foram corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a FITC.

4.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados obtidos no experimento 2, as variáveis foram analisadas pelo programa General Linear System (GLS) do Statistics Analysis System (SAS) utilizando o modelo que incluiu o efeito grupo com dois níveis (maturação nuclear) ou três níveis (maturação citoplasmática) sendo que as variáveis foram previamente transformadas em raiz quadrada das mesmas mais 0,5.

4.3 RESULTADOS

Não houve diferença estatística com relação ao número total de oócitos entre os grupos D4 e D8 (78 vs 97 respectivamente), taxa de maturação nuclear (74,35% vs 53,60%) e citoplasmática (maturos - 48,71% vs 30,92%, transição – 25,64% vs 39,17% e imaturos 25,64% vs 29,89% respectivamente), tabela 4.

Tabela 4. Número total de oócitos, taxa de maturação nuclear e citoplasmática nos grupos D4 e D8. (n=6 vacas Nelore por grupo).

GRUPOS	Oócitos totais (média)	MATURAÇÃO NUCLEAR		MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA		
		Maturos	Imaturos	Maturos	Transição	Imaturos
D4	78 (13)	58 (74,35%)	20 (25,6%)	38 (48,71%)	20 (25,64%)	20 (25,64%)
D8	97 (16)	52 (53,60%)	45 (46,39%)	30 (30,92%)	38 (39,17%)	29 (29,89%)

Na mesma linha, valores não diferem.com nível de significância 5% ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 e 2

Os grupos D3, D5, D7 e D9, não diferiram entre si com relação ao número de folículos (≥ 2 mm) visualizados através da ultra-sonografia (195, 189, 161, 151, respectivamente, tabela 2), porém nota-se uma tendência dos animais dos grupos D3 e D5 a apresentarem mais folículos, o que refletiu em um maior número de estruturas recuperadas por meio da OPU (152, 148, 116, 111 respectivamente, tabela 1), mas sem apresentar novamente diferença estatística observando-se o mesmo na taxa de recuperação (77,94%; 78,30%; 72,04%; 73,50% respectivamente, tabela 1).

Isto pode estar associado ao início da onda (D3 e D5) onde os folículos são pequenos e mais numerosos, pois se encontram numa fase inicial de crescimento, já nos grupos D7 e D9, alguns folículos já tendem a entrar em atresia e regredirem, diminuindo assim o número total de estruturas visualizados nos ovários, além disso, o folículo dominante (maior folículo) e o segundo maior folículo, possuem maior diâmetro e tendem a ter menor taxa de recuperação, pois folículos > 4 mm tendem a ter menor taxa de recuperação (50%) do que folículos < 4 mm (72,2%) mas sem diferirem na taxa de produção de blastocistos (SENEDA et al., 2001), o que foi confirmado posteriormente em outro experimento onde o diâmetro do folículo aspirado também não influenciou na taxa de blastocistos (CASTILHO, 2003).

Estes dois fatores, menor número e maior diâmetro, podem influenciar na taxa de recuperação de oócitos de acordo com a fase do ciclo estral em que a doadora é submetida à OPU.

Também não houve diferença estatística entre o número total de oócitos viáveis (contrariando a hipótese 1) provenientes dos 4 grupos (133, 137, 103, 97, tabela 1) sendo que novamente os grupos D3 e D5 tiveram numericamente maior quantidade de estruturas viáveis, isto pode ser reflexo da tendência destes dois grupos de terem mais folículos, melhor taxa de recuperação e número de estruturas recuperadas.

Quando os oócitos totais foram subdivididos pelo grau de qualidade (GI, GII, GIII e desnudo) em cada grupo, também não houve diferença significativa, sendo

que há mais uma vez uma tendência de melhor qualidade dos oócitos aspirados no início da onda (D3 e D5, Tabela 2).

A taxa de clivagem também foi semelhante entre os grupos (79,69%; 83,21%; 71,84%; 76,28% respectivamente, tabela 3).

Com relação ao número total de blastocistos os grupos D3 e D5 não diferiram entre si (66 vs 62), porém foram superiores ($P < 0,05$) aos grupos D7 e D9 (34 vs 35 tabela 5). Entre os grupos D7 e D9 também não houve diferença. A taxa de produção de blastocistos foi de 49,62% e 45,25% para os grupos D3 e D5 respectivamente, sendo superior aos dos grupos D7 e D9, 33,00% e 36,09% respectivamente. Estes resultados confirmam a segunda hipótese onde o momento mais propício para a obtenção de oócitos através da OPU, seria próximo à fase do desvio folicular, onde os oócitos teriam melhor competência oocitária, tendo assim condições mais adequadas de maturação, fertilização e conseqüentemente se desenvolver até a fase de blastocistos. Os resultados deste experimento estão de acordo com os resultados de trabalhos publicados onde não houve diferença na produção de blastocistos quando se recuperou os oócitos nos dias 2, 3 ou 5 da onda folicular (CASTILHO, 2003, HENDRIKSEN et al., 2004, MACHATKOVÁ et al., 2004), e que somente em fases mais avançadas do período de dominância, dias 7 ou 8, houve uma queda na produção concluindo que neste período um possível estágio avançado de atresia compromete a competência oocitária nos folículos subordinados (VASSENA et al., 2003, MACHATKOVÁ et al., 2004, HENDRIKSEN et al. 2000, 2004).

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado que oócitos provenientes de folículos maiores se desenvolvem melhor *in vitro* (PAVLOK et al., 1992; LOONERGAN et al., 1994; ARLOTTO et al., 1996; HAGEMANN et al., 1999b), o que poderia ser explicado pelo fato que estes folículos maiores terem sido expostos ao LH por maior período, ou seja, maturados *in vivo*, mas em contrapartida os folículos subordinados, mais numerosos, tendem a estar em grau avançado de atresia e portanto terem sua competência oocitária afetada, podendo levar a baixa produção e qualidade dos embriões. Outro fator relevante é que os protocolos laboratoriais de produção *in vitro*, são baseados em estudos realizados com oócitos obtidos de ovários provenientes de abatedouro, onde os meios e o tempo de maturação são padronizados para os oócitos serem maturados *in vitro* e não padronizados para oócitos que sofreram maturação *in vivo*.

No Experimento 2, também não houve diferença no número total de oócitos totais recuperados nos grupos D4 e D8 (78 vs 97 respectivamente, Tabela 4) confirmando resultados do experimento 1, onde independente da fase da onda folicular a taxa de recuperação de oócitos viáveis é semelhante. Mas quando analisamos a taxa de oócitos que sofreram maturação nuclear concluímos que na fase inicial da onda ocorre uma maior porcentagem de maturação nuclear (74,35% vs 53,60% respectivamente). Quanto à taxa de maturação citoplasmática, o grupo D4 foi superior ao grupo D8 maduros (48,71% vs 30,92%, respectivamente, Tabela 4). O pequeno número de animais (n=6) pode explicar a ausência de uma diferença estatística significativa com relação às taxas de maturação nuclear e citoplasmática,

No experimento 1, apesar de não obtermos maior qualidade e/ou qualidade subjetiva dos oócitos, a taxa final de produção de Blastocistos foi superior quando recuperamos oócitos no início na onda (D3 E D5), isto pode ser explicado com os resultados do experimento 2, pois as taxas de maturação foram superiores no início da onda. Portanto estes resultados são importantíssimos para nos auxiliarem no estudo da dinâmica folicular na raça Nelore, e melhorarmos as taxas de PIV de embriões bovinos em nossos laboratórios.

Outro fato bastante interessante obtido no experimento 2, foi a observação de uma assincronia entre a taxa de maturação nuclear e citoplasmática, sendo que a primeira obteve maiores porcentagens tanto para o grupo D4 (74,35% vs 48,71%) quanto para o D8 (53,60% vs 30,92%).

Quando analisamos os resultados da maioria dos laboratórios, tanto comerciais quanto de pesquisa, observamos que as taxas de clivagem são em torno de 70 a 80% dos oócitos viáveis, estes números estão próximos das taxas de maturação nuclear obtidas no experimento 2, porém as taxas de produção de blastocistos são bem mais baixas, e variam entre 40 e 50% sendo estas muito próximas das taxas de maturação citoplasmáticas, estes resultados merecem atenção especial, pois a baixa maturação citoplasmática pode estar sendo o grande limitador nos índices da PIV. Portanto a pesquisa mais aprofundada da maturação citoplasmática, pode futuramente aperfeiçoar e melhorar as taxas de produção e qualidade dos embriões in vitro permitindo inclusive sua melhor sua criopreservação para uso posterior dos embriões.

Baseado nestes fatos, a recuperação de oócitos realizada no início da onda em vacas Nelore, seria mais indicada do que em relação a fases avançadas de dominância, pois teríamos uma melhor competência oocitária, o que acarretaria numa maior produção final de blastocistos, já que estes oócitos adquirem competência para se desenvolver em um sistema *in vitro* quando o folículo adquire um diâmetro de 2 a 3 mm (BLONDIN; SIRARD, 1995).

6. CONCLUSÃO

Experimento 1

- 1.** Não houve diferença estatística com relação ao total de folículos (≥ 2 mm) visualizados na ultra-sonografia assim como no total de estruturas e oócitos viáveis recuperadas através da OPU no momento da aspiração nos 4 grupos (contrariando a hipótese 1)
- 2.** Não houve diferença na qualidade dos oócitos e na taxa de clivagem dos oócitos nos 4 grupos.
- 3.** O número total e a porcentagem de blastocistos produzidos foram maiores nos grupos D3 e D5 do que nos grupos D7 e D9 (confirmando a hipótese 2).

Experimento 2

- 1.** Não houve diferença significativa nas taxas de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos provenientes dos grupos D4 e D8, contrariando a hipótese testada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS G.P., MATTERI R.L., KASTELIC J.P., KO J.C.H., GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, v.94, p.177-88, 1992.
- ADAMS, G.P., KOT, K., SMITH, C.A., GINTHER, O.J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Can. J. Anim. Sci.**, v.73, p.267-75, 1993a.
- ADAMS, G.P., KOT, K., SMITH, C.A., GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.30, p.259-71, 1993b.
- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v.41, p.19-24, 1994
- ADAMS, G.P., JAISWAL.R., SING.J., MALHI.P., Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80 2008.
- ARMSTRONG D.T., IRVINE B.J., EARL C.R., McLEAN D., SEAMARK R.F. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 1227-1236, 1994.
- AUSTIN E.J., MIHM M., EVANS A.C.O., KNIGHT P.G., IRELAND J.L.H., ROCHE J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 64, p. 839-848, 2001.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - ACNB, <http://www.nelore.org.br>. Informação capturada em 12/07.
- BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., FIGUEIREDO, R.A., Intervalo estro ovulação e desenvolvimento folicular ovariano em novilhas Nelore tratadas com PGF. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p.251, 1994.
- BLOCKEY, M.A. Sheep and cattle mating behavior. **Rev. Rural Sc.**,v.4, p.53-52, 1980.
- BLONDIN P., BOUSQUET D., TWAGIRAMUNGO H., BARNES F., SIRARD M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol Reprod**, v. 66, p. 38-43, 2002.
- BODENSTEINER, K.J., WILTBANK, M.C., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.499-12, 1996a.
- BODENSTEINER, K.J., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.1115-28, 1996b.
- BOLS P.E.J., VANDENHEEDE J.M.M., VAN SOOM A., Transvaginal ovum-pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, p. 677-687, 1995.
- BORDIGNON V., MORIN N., DUROCHER J., BOUSQUET D., SMITH L.C. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, v.48, p.291-298, 1997.

BRACKET B.G., BOUSQUET D., BOICE M. L., DONARVICK W. J., EVANS J. F. DRESSEL M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol Reprod**, v. 27, p.147-158, 1982.

BROGLIATTI, G.M., ADAMS G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v.45, p. 1163-1176, 1996.

BUNGARTZ, L., LUCAS-HAHN A., RATH D., NIEMANN H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, n. 667-675, 1995.

CAROLAN, C., LONERGAN P., MONGET P., MONNIAUX D., MERMILLOD P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 43, p. 477-483, 1996.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G. P., BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in nelore (*Bos indicus*) heifers **Animal . Reproduction Science**, v.98, p.189 -196, 2007.

CASTILHO, C. **Divergência no crescimento folicular e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário In vitro em novilhas da raça Nelore.** Jaboticabal, 2003 90 p. Tese de Doutorado. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista.

CAVALIERI. J., RUBIO, I., KINDER, J.E., ENTWISTLE, K.W., FITZPATRICK, L.A. Synchronization of estrus and ovulation associated endocrine change in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.47, p.801-814, 1997

CHAUBAL, S.A., FERRE, L.B., MOLINA, J.A., FABER D.C., BOLS, P.E.J., REZAMAND, P., TIAN, X., YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in OPU-IVP system. **Theriogenology**, v.67, p. 719-728, 2007.

CHERR, G.N.; DROBNIS, E.Z.; KATZ, D.F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 246, p. 81-93, 1988.

CLARKE, J.J . GnRH secretion . INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AN ARTIFICIAL INSEMINATION ,5, 1988, Dublin, **Anais...** Dublin, 1988. p. 1-9.

DAYAN, A., WATANABE M.R., WATANABE Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FI. **Arq Facul Vet UFRGS**. V. 28, p. 181-185, 2000.

DE LOSS, F., KASTROP, P ., VAN MAURYK., VANBENEDEN T,H., KRUIP,T.A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Mol. Reproductive Dev**.28, 255-9,1991.

DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M., VAN TOL, H.T.M., WILLEMSE A.H. Pheripheral plasma concentrations of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrus cycle in the cow , with emphasis on peri-oestrous period. **Anim. Reprod. Sci.**, v.10, p.257-92, 1986.

ESCOBEDO, F., ENCISO, A., GOMEZ, G., SISNEROS, E., COPUY, A., CALLEGOS, J., KINDER, J.E., GARCIA-WINDER, M. Norgestomet induces estrous but not ovulation in prepubertal *Bos taurus* x *Bos indicus*. *J. Anim. Sci.*, v.67, p. 410, 1989.

ESSLEMONT, R.J., GLENCROSS, R.J., BRYANT, N.J., POPE, G.S. A quantitative study of pre-ovulatory behavior in cattle (British friesian heifers). ***Appl. Anim. Ethol.***, v.6 p.1-17, 1980.

EVANS A.C.O., KOMAR C.M., WANDJI A.S., FORTUNE J.E. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the estrous cycle. ***Biol. Reprod.***, v. 57 , p.394-401, 1997.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? ***Anim.Reprod.Sci.*** v.42, p. 111-25, 1993

GALINA ,C.S., ARTHUR G.H. Oestrus cycles. ***Anim. Breed .Abstr.***, v.58, p. 697-707, 1990.

GALLI C., CROTTI G., NOTARI C., TURINI R., DUCHI R., LAZZARI G. Embryo production by ovum pick up from live donors. ***Theriogenology***, v. 55, p. 1341-57, 2000.

GARCIA A., SALAHEDDINE M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, V. 50, p. 575-585, 1998.

GIBBONS J.R., WILTBANK M.C., GINTHER O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. ***Biol Reprod.*** v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER O.J., KNOPF L., KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. ***J Reprod Fertil.*** v.87, p.223-30, 1989.

GINTHER O. J., WILTBANK M.C., FRICKE P. M., GIBBONS J.R., KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. ***Biol Reprod.*** v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J., KOT, K, KULIC, L.J., WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular fluid waves in cattle. ***J. Reprod. Fétil.***, v. 109, p. 75-87, 1997a.

GINTHER, O.J., KOT, K, KULIC, L.J., WILTBANK, M.C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle. ***J. Reprod. Fertil.***, v.109, p. 181-6, 1997b.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. ***Anim. Reprod. Sci.***, v. 61, p.60-61, 2000.

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

HAGEMANN L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. ***Theriogenology***, v.51, p.449-459, 1999.

HAFEZ, E.S.E. ***Reproduction in farm animals***. 6.ed. Philadelphia: Lea & febige, 1993.p.23

HASLER J.F., HENDERSON W.B., HURTGEN P.J., JIN Z.Q., McCAULEY A.D., MOWER S.A., NEELY B., SHUEY L.S., STOKES J.E., TRIMMER S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p. 141-152, 1995.

HENDRIKSEN P.J.M., STEENWENG W.N.M., HARKEMA J.C., MERTON J.S., BEVERS M.M., VOS P.L.A.M., DIELEMAN S.J. Effect of different stages of follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.61, p. 909-920, 2004.

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**, v.53, p. 11-20, 2000.

HEYMAN Y. National Statistical data of bovine embryo transfer activity in Europe (1996). **Proc European Embryo Transfer Assoc**, 13th Sci Mtg, p. 27-67, 1997

IRELAND, J.J., ROCHE J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicle during a bovine estrus cycle. In ROCHE, J.F, O' CALLAGHAN, D. **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: Nijhoff, 1987. p. 1-18.

KO J.C.H., KASTELIC J.P., DEL CAMPO M.R., GINTHER O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers. **J. Reprod Fert**, v. 91, p. 511-519, 1991.

KNOPFT, L., KASTELIC, J.P., DEL CAMPO, M.R., GHINTER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Anim.Endocrinol.** v.6, p. 111-9, 1989.

KRUIP T.A.M., BONI R., WURTH Y.A., ROELOFSEN M.W.M., PIETERSE M.C. Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. **Theriogenology**. v. 42, p. 675-684, 1994

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. **Mol Reprod Dev**, v. 37, p. 48-53, 1994.

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

LOWMAN, B.G., SCOTT, N.A., SOMERVILLE, S.H. Condition scoring of cattle. **Bull. East Scotl.**, n.6, p.1-31, 1976.

LUQUE, E.H., HUTER, J.C., MONTES, G.S. Regulacion hormonal de los ciclos reproductivos en la vaca. **Rev.Med.Vet.**v.64, p. 190-211, 1983.

MACHATKOVÁ M., JOKESOVÁ E., PETELÍKOVÁ J., DVORÁČEK V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801-810, 1996.

MACHATKOVÁ M., KRAUSOVA K., JOKESOVÁ E., TOMANEK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and phase follicular wave on embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329-335, 2004.

MEINTJES M., BELLOW M.S., BROUSSARD J.R., PAUL J.B., GODKE R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. **J Anim Sci**, v. 73, p. 967-974, 1995.

MIHM, M., GOOD, T.E.M., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., KNIGHT, P.G., ROCHE, J.F., Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1328-37, 1997.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, Progesterona e Estradiol que precedem a ovulação em fêmeas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus)**. São Paulo, 2003.98p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Campus de São Paulo..

MUKASA-MUGERMA , E. A. Review of reproductive performance of female Bos indicus (Zebu) cattle. **ILCA Monograf.**, v.6, p.1-34, 1989.

MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **J Reprod. Fertil.**, v.90, p. 523-33, 1990.

PAVLOK A., LUCANS-HAHN, NIEMANN H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v.31, p. 63-67, 1992.

PEIXER M.A.S., SOUZA R.V., RUMPF R., DE BEM A.R., NETO M.A.P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no cenargem. **Zootecnia, Nova Odessa**, v. 32, p. 49, 1994.

PIERSON R.A., GINTHER O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP T.A.M., TAVERNE M.A.M. Tranvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 35, p.19-24, 1991.

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

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.

ROCHE, J.F. BOLAND, M.P. Turnover of dominant follicles in cattle in different reproductive stages. **Theriogenology**, v.44, p.81-90, 1991.

RODRIGUES C.F.M., GARCIA J.M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arq Fac Vet UFRGS**, v. 28, p. 186-187, 2000.

SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELD, D.R., GINTHER, O.J., BARROS,CM. Morfological characterization of follicle deviation on Nelore (*Bos Indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAVIO J.D., KEENAN L., BOLAND M.P., ROCHE J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v.83, p.663-71, 1988.

SENEDA M.M., ESPER C.R., GARCIA J.M., de OLIVEIRA J.A., VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **An Reprod Sci**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SMITH, L.C., OLIVEIRA-ANGEL, M., GROOME, N.P., BHATIA, B., PRICE, C.A. Oocyte quality in small antral follicle in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. **Can. J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.193-9, 1996.

SIRARD M.A., PICARD L., DERY M., COENEN K., BLONDIN P. The time between FSH administratin and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.51, p. 699-708, 1999.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-17, 1988.

SIROIS J., FORTUNE J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v.127, p.916-25, 1990.

STOCK, A.E., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* , v. 132, p. 1108-14, 1983.

STOCK A.E., SMITH L. Developmental of bovine oocytes from small follicles is enhanced after maturation in medium conditioned by oocytes from big follicles. **Biol Reprod**, v. 55 , p.174 :(472), 1996. Abstr.

STUBBINGS R. B., WALTON J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, p.705-712, 1995.

SUNDERLAND S.J., CROWE M.A., BOLAND M.P., ROCHE J.F., IRELAND J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 101, p. 547-555, 1994.

THIBIER. M. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still rise and contrasted trends in other species in 2005.IETS, NEWSLETTER, 2006. 24(4).

WATANABE M.R. **Aspiração *in vivo* de oócitos em fêmeas nelore de diferentes idades reprodutivas mediante punção vaginal guiada por ultra-som.** Jaboticabal, 2002. 48p. DISSERTAÇÃO (mestrado) – FCAV – UNESP – Jaboticabal.

WIT A.A.C., WURTH Y.A., KRUIP T.A.M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus*-oocyte complex. **J Anim Sci**, v. 78, p. 1277-83, 2000.

WOLFSDORF, K.E., DIAZ, T., SCHMITT, E.J.P. THATCHER, M.J., DROST, M., THACTER, M.M. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development **Theriogenology**, v.48, p.435-47, 1997.

WRIGHT , P.J., MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. **Appl. Food Anim.Pract.**, v.8 p.57-59, 1992.

YUAN W., BAO B., GARVERICK H.A., YOUNQUIST R.S., LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v. 15(1), p. 55-63, 1998.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.90, p:279-85, 1990.

VASSENA.R., MAPLETOFT J.R., ALLODI S., SINGH.J., ADAMS P.G. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p 923-932, 2003.