

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

PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES DE BOVINOS DA
RAÇA NELORE ORIUNDOS DE OVÓCITOS DE OVÁRIOS COM
E SEM CORPO LÚTEO

Cristiano Pereira Barbosa
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2011

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

**PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES DE BOVINOS DA
RAÇA NELORE ORIUNDOS DE OVÓCITOS DE OVÁRIOS COM
E SEM CORPO LÚTEO**

Cristiano Pereira Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2011**

B238p Barbosa, Cristiano Pereira
Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça Nelore oriundos
de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo / Cristiano Pereira
Barbosa. – – Jaboticabal, 2011
ix, 56 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Gilson Hélio Toniollo

Banca examinadora: Benedito Dias de Oliveira Filho, José
Octávio Jacomini, Joaquim Mansano Garcia, Vera Fernanda Martins
Hossepian de Lima

Bibliografia

1. Produção *in vitro*. 2. Corpo lúteo. 3. Bovino. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CRISTIANO PEREIRA BARBOSA – nasceu em Uberlândia – MG em 18/09/1973. Formou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 15 de dezembro de 1995. Trabalhou de 1996 a 2000 nas áreas de Reprodução, Clínica e Cirurgia de bovinos. Tornou-se Mestre em Ciências Veterinárias – Clínica e Cirurgia em 09/05/2003, pela Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) – UFU. Concluiu o Doutorado em 11/03/2011 pela UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Área de Reprodução Animal. Foi professor substituto de Obstetrícia Animal pela FAMEV – UFU, de junho de 2008 a junho de 2010. Desde 02/04/2002 é professor na Universidade de Uberaba (UNIUBE), no curso de Medicina Veterinária, ministrando as disciplinas de Obstetrícia Animal e Patologia e Clínica da Reprodução.

“É muito melhor ousar fazer coisas grandiosas, triunfar gloriosamente, mesmo que com alguns fracassos no meio do caminho, do que se igualar àquelas pobres almas que não aproveitam nem sofrem muito, pois vivem na penumbra cinza de quem não sabe o que é a vitória nem a derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, por simplesmente TUDO.

Às minhas filhas Giovana e Rafaela, meus incentivos de todo dia.

À minha esposa Adriana pela compreensão nos momentos de ausência, pela força e pelo carinho.

Ao meu pai Antônio e minha mãe Alívia, pelo incentivo a cada etapa de minha vida e pelas orações que sempre me fortaleceram.

Ao meu irmão Fernando por me apoiar sempre que precisei.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Gilson Hélio Toniollo, que mais que um orientador foi sempre um grande amigo. A sua humildade associada à competência o faz uma pessoa admirável e que cumpre o papel de um educador. O seu exemplo está aí para ser seguido, faça-o quem puder.

Ao professor Ednaldo Carvalho Guimarães pela orientação na estatística do trabalho.

À UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, pela grande oportunidade de me permitir cursar o Doutorado. Serei sempre grato.

Aos professores da pós-graduação desta Faculdade cujas disciplinas ministradas nos fazem pensar diferente, motivados a seguir neste caminho da ciência.

Aos colegas discentes desta pós-graduação pela colaboração e amizade.

À Minha grande amiga Anna (minha comadre) por sempre acreditar em mim.

Ao professor Humberto Eustáquio Coelho e ao Sr. Hélio Alberto (“Ébano e Marfim”), pelos conselhos e incentivos ao longo de toda esta jornada.

Ao amigo José Olavo Jr. por sempre me incentivar.

Aos colegas da UNIUBE e da UFU pelo apoio, como também aos colegas de estrada Brandão, Geison, Wanderson e Joice.

Aos colegas Rodrigo Calixto, Diogo, Anderson (Peu), Patrick, Nei e Flávio Pardi, que nunca mediram esforços no grandioso auxílio na parte prática deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. OBJETIVOS.....	11
3.1- Gerais.....	11
3.2- Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1- Animais.....	12
4.2- Local e Período.....	13
4.3- Geral.....	14
4.4- Aspiração folicular para obtenção dos ovócitos.....	15
4.5- Lavagem, Seleção e Transporte dos ovócitos.....	16
4.6- Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos (MIV).....	17
4.7- Fecundação <i>in vitro</i> dos ovócitos (FIV).....	17
4.8- Cultivo <i>in vitro</i> dos zigotos (CIV).....	18
4.9- Inovulação dos embriões.....	19
4.10- Análises Estatísticas.....	20
4.10.1- Descrição das variáveis analisadas.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1- Avaliação de todos os grupos conjuntamente.....	22
5.2- Avaliação dos grupos com presença de CL em um dos ovários.....	23
5.3- Avaliação dos grupos sem a presença de CL nos ovários.....	27
5.4- Avaliação de todos os grupos em relação à concentração de progesterona sérica.....	28
5.5- Avaliação geral dos resultados.....	30
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42

PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES DE BOVINOS DA RAÇA NELORE ORIUNDOS DE OVÓCITOS DE OVÁRIOS COM E SEM CORPO LÚTEO

RESUMO – A produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos tem se estabelecido a cada dia como uma biotecnologia de uso frequente, devido à rapidez na multiplicação de produtos oriundos de fêmeas de alto valor genético. Este trabalho comparou a produção de ovários com e sem corpo lúteo (CL) de vacas Nelore, em relação à quantidade e qualidade de ovócitos recuperados, embriões produzidos, taxas de prenhez e proporção dos sexos após a PIV. Foram realizadas aspirações foliculares dos dois ovários em 250 seções, igualmente distribuídas em cinco grupos, sendo G1=fêmeas gestantes; G2=não gestantes, com CL e submetidas à tratamento hormonal com progestágeno+BE+PGF_{2α}; G3=não gestantes, sem CL e com o mesmo tratamento de G2; G4=não gestantes, com presença de CL e sem tratamento; G5=não gestantes, sem presença de CL e sem tratamento. Os resultados foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Tukey para comparação entre médias, a 5% de significância, pelo programa SISVAR. Já para comparação de proporção de sexos dentro e entre os grupos, foi utilizado o teste de comparação múltipla de proporções. O G4 produziu maior média de ovócitos totais aspirados que G2 e G3. Comparando os três grupos que apresentavam CL (G1, G2, G4), o G4 foi superior a G1 e G2 em ovócitos totais, no ovário com e sem CL. Em ovócitos viáveis, G2 foi superior a G1 no ovário com CL. Os ovários com CL produziram mais embriões do que os sem CL. As vacas gestantes produziram melhor nos ovários sem CL, com mais ovócitos viáveis ($p<0,05$) e iguais em embriões ($p>0,05$), em relação ao ovário com CL. As taxas de prenhez e proporção dos sexos foram semelhantes entre os grupos ($p>0,05$). A concentração de P₄ foi diferente entre os grupos, mas não influenciou as variáveis analisadas. A utilização do tratamento hormonal não melhorou os resultados de nenhuma variável. A escolha da doadora para PIV independe de tratamento hormonal ou presença de CL.

Palavras-chave: aspiração folicular, progesterona sérica, reprodução animal

***in vitro* PRODUCTION OF NELORE BOVINE EMBRYOS ORIGINATING OF OOCYTES FROM OVARIES WITH AND WITHOUT CORPUS LUTEUM**

SUMMARY – The *in vitro* production (IVP) bovine embryos has been established each day as a frequent use of biotechnology because of the speed of the multiplication products from females of high genetic value. This study compared the production of ovaries with and without corpus luteum (CL) of cows in relation to quantity and quality of oocytes aspirated, embryos obtained, pregnancy rates and sex ratio after the IVP. Follicular aspirations were performed on both ovaries in 250 sections, equally divided into five groups: G1 = pregnant, G2 = not pregnant, with CL and submitted to hormonal therapy with progesterin+BE+PGF_{2α}; G3 = not pregnant, without CL and with the same treatment of G2; G4 = not pregnant, with the presence of CL and no treatment; G5 = not pregnant, without the presence of CL and no treatment. The statistical analysis was performed with analysis of variance (ANOVA) and the Tukey Test was applied to compare means at 5% significance level, by SISVAR program. To the comparison of sex ratio within and between groups was used the multiple comparison test of proportions. The G4 has produced higher mean total aspirated oocytes than G2 and G3. Comparing the three groups that had CL (G1, G2, G4), G4 was higher than G1 and G2 in total oocytes in ovaries with and without CL. G2 was superior to G1, on viable oocytes from ovary with CL. Ovaries with CL produced more embryos than those without CL. The ovaries without CL produced better in pregnant cows in despite of viable oocytes ($p < 0.05$) and similar embryo production ($p > 0.05$), when compared with ovaries presenting CL. Pregnancy rates and sex ratio were similar between groups ($p > 0.05$). The P₄ concentration was different between groups, but did not influence any variable. The use of hormonal treatment did not improve the results of any variable. The choice of donor for PIV is independent of hormone treatment or presence of CL.

Keywords: animal reproduction, follicular aspiration, serum progesterone

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos 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 ovócitos 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 realizada sem maiores alterações aparentes no trato reprodutivo, independente da fase do ciclo estral (BLONDIN et al., 2002).

Na PIV também existe variabilidade individual na produção de embriões e de gestações, com vários fatores podendo afetar a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* até a fase de blastocistos, que permanece em torno de 30% do total de ovócitos submetidos a maturação. De 8 a 10 ovócitos colhidos pela *OPU*, há uma produção média de 2 embriões transferidos em doadoras de raças européias (GALLI et al., 2001). 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*.

Os índices de prenhez de receptoras inovuladas com embrião de PIV oscilam entre os programas. Os fatores responsáveis por estas variações estão sendo estudados de forma geral e específica, abrangendo desde a fêmea doadora de ovócitos até o manejo das receptoras (DAYAN et al., 2000).

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 (principalmente China e Coréia), representando 48,6% e 47,9%, respectivamente (THIBIER, 2006).

A capacidade para fecundação e desenvolvimento de ovócitos maturados *in vivo* é maior que daqueles maturados *in vitro* (BLONDIN et al., 2002). O momento da obtenção dos ovócitos durante a onda folicular é importante para determinar a qualidade dos mesmos (SIRARD et al., 1999).

O desenvolvimento dos folículos até o estágio ovulatório compreende três fatores em uma sequência de eventos que são recrutamento, seleção e dominância folicular. Neste período existe necessidade sequencial de gonadotrofinas como FSH (hormônio folículo estimulante) para recrutamento e LH (hormônio luteinizante) para dominância e uma grande variabilidade de parâmetros numéricos e temporais como o número de ondas por ciclo e de folículos por onda, bem como o tempo da seleção e a duração da dominância (DRIANCOURT et al., 2000).

Nas espécies monovulatórias o processo de desenvolvimento de um folículo dominante e a atresia dos folículos subordinados é chamado de desvio e ocorre durante uma onda. O desvio é precedido por uma fase de crescimento comum dos folículos, em que todos apresentam condições de futura dominância, mas ainda sem exercê-la. Este evento se inicia quando os dois maiores folículos alcançam uma média de 8,5 e 7,7 mm de diâmetro nos bovinos, ou em torno de 3 dias após o pico de FSH. O folículo selecionado é, portanto, definido como folículo dominante e suprime ativamente o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (GINTHER et al., 2003).

O crescimento do ovócito 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 ovócitos 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 ovocitária 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 influenciar na qualidade do ovócito (HENDRIKSEN et al., 2000).

Os folículos pré-antrais crescem fundamentalmente com o aporte de estimuladores locais. Quando desenvolvem o antro folicular, entre 4 e 8 mm, eles são

dependentes de FSH e independentes de LH, enquanto que a partir de 9 mm o crescimento só ocorre na presença de LH ou FSH exógeno. Além das gonadotrofinas, os peptídeos sintetizados localmente regulam a fase antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos como endócrinos (WEBB et al., 2003).

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina que se forma no ovário, seguinte a uma ovulação e contribui para a regulação do ciclo estral e manutenção da gestação. Em bovinos o CL desenvolve, funciona e inicia a regressão dentro de um período de 17 a 18 dias após a ovulação durante o ciclo estral, mas pode permanecer funcional por mais que 200 dias durante a gestação (NISWENDER et al., 2000).

O principal produto de secreção do CL é a 17-Hidroxi-progesterona (P_4). A produção de P_4 se deve à atividade luteotrópica do LH que se liga aos seus receptores nas células da granulosa do folículo, ativando a enzima adenil-ciclase (AC) a aumentar os níveis de AMPc que estimula a aromatase a produzir progesterona (OLIVERA et al., 2007).

A formação do corpo lúteo é iniciada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, nas células da teca interna e granulosa do folículo pré-ovulatório. A principal função do CL é secretar progesterona (P_4) durante o ciclo estral não gestante, bem como durante a gestação (SCHAMS & BERISHA, 2004).

A P_4 inibe a liberação do pico pré-ovulatório de LH, visto que com a luteólise e remoção de progesterona desencadeia-se uma onda de LH capaz de induzir o crescimento final do folículo pré-ovulatório, culminando com a ovulação (MORAES et al., 2001).

A aspiração folicular é realizada em momentos aleatórios do ciclo estral, tendo como consequência, grande quantidade de folículos atresícos. Desta forma, a crescente necessidade de melhorar a eficiência da técnica e o acréscimo de demanda para situações menos favoráveis (animais com menor produção de ovócitos), apontam para um incremento na utilização de protocolos pré-aspiração. O objetivo seria regularizar as ondas foliculares, padronizando os folículos para a OPU (SENEDA et al., 2006).

Embora os implantes de progestágenos sejam bastante utilizados em protocolos prévios a aspiração folicular, o curto período de utilização dos mesmos permite o

questionamento de sua necessidade. Também outro questionamento importante refere-se à aplicação de PGF_{2α} previamente a aspiração, visando evitar a presença de corpo lúteo no momento da OPU, facilitando desta maneira a manipulação dos ovários (SENEDA et al., 2006).

As fêmeas gestantes têm seus folículos aspirados normalmente, mas às vezes o ovário com CL é evitado, para se preservar uma possível luteólise e consequente abortamento (SAUVÉ, 1998).

É de grande importância conhecer a influência do CL local no ovário e a influência dos implantes de progesterona, sobre a produção e a disponibilidade de folículos, a qualidade dos ovócitos e embriões produzidos, em programas de PIV, a fim de servirem como ferramenta para auxiliarem em futuras estratégias de trabalho com doadoras de ovócitos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Durante o período de uma onda folicular ocorrem o recrutamento e desenvolvimento dos folículos, o estabelecimento da dominância e o desenvolvimento até folículo pré-ovulatório. No ciclo estral bovino pode ocorrer desde uma até quatro ondas, sendo que diversos fatores influenciam o número de ondas durante o ciclo, como nutrição, ordem de partos, condição corporal, lactação, amamentação, idade, raça e ambiente (GINTHER et al., 1996).

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 pela administração de gonadotrofinas (ADAMS, 1994).

De acordo com REIS et al. (2006) existe uma estreita relação entre as fases do ciclo estral das vacas, tanto na quantidade e qualidade de complexo cumulus-ovócito (COC), quanto em embriões produzidos *in vitro*, onde os ovócitos provenientes de ovários contendo CL são melhores que os sem CL.

Os ovócitos oriundos de folículos que tiveram seu desenvolvimento na fase de diestro, ou seja, em um ambiente com maior concentração de progesterona, são de melhor qualidade, sugerindo que a P_4 exerce função importante sobre a qualidade embrionária (BLONDIN & SIRARD, 1995 e LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

A progesterona permite que o folículo seja exposto por um maior período a pequenos pulsos de LH podendo melhorar a qualidade ovocitária (GREVE et al., 1995)

CASTILHO et al. (2007) relataram que em novilhas Nelore no momento da divergência folicular (2,7 dias pós-ovulação), as concentrações séricas de P_4 já se elevam enquanto as de FSH não se alteram, indicando a importância da P_4 no crescimento do folículo dominante, em animais que ainda não estão com CL consolidado.

Existe um nível de P_4 adequado, capaz de influenciar a qualidade ovocitária mesmo que de forma indireta. Este fato pode estar relacionado com a frequência dos pulsos de LH e dos níveis de atresia de cada tratamento à base de progesterona e progestágenos (SCHNEIDER et al., 2005).

Segundo WIJAYAGUNAWARDANE et al. (1998) a progesterona produzida pelo corpo lúteo pode ser encontrada na tuba uterina e nos vasos do parênquima do ovário ipsilateral ao CL funcional, em maiores concentrações do que no contra-lateral.

No trabalho de REIS et al. (2006) as vacas com CL foram superiores às vacas em fase folicular, mas sem a presença de CL. Os dados comprovaram maiores vantagens para a presença do CL em relação às seguintes variáveis, maior número de ovócitos coletados dos dois ovários, mais ovócitos de melhor qualidade, mais zigotos que clivaram, além de produzirem, em geral, maior número de embriões aos sete dias após a FIV.

REIS et al. (2002) comparando a produção de embriões *in vitro*, em novilhas aspiradas em dois momentos do ciclo estral, verificaram que na fase de maior concentração sérica de progesterona foi obtida maior quantidade de COC (complexo cumulus-ovócito) do que na fase de baixa concentração, porém a qualidade do ovócito e as taxas de maturação, fecundação e clivagem foram semelhantes.

Os progestágenos se ligam aos receptores de progesterona, mas não apresentam respostas biológicas idênticas (STANCZYK, 2003). Os protocolos com benzoato de estradiol e progesterona por um período de 7 a 9 dias, permitem a sincronização de uma nova onda folicular 4 a 5 dias após o início do tratamento. No momento da retirada dos dispositivos, sejam eles novos ou reutilizados, a administração de uma dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$) ou seus análogos e de uma dose de 0,5 a 1 mg de benzoato de estradiol, 24 horas depois, asseguraram a ocorrência de ovulação (BÓ et al., 2003).

SCHNEIDER et al. (2005) ao compararem vacas com alta (2 implantes) e baixa (1 implante reutilizado) concentração de P_4 , em relação às vacas sem aplicação de implantes, verificaram que as vacas tratadas com implantes de progesterona apresentaram aumento na disponibilidade de folículos na punção folicular, aumento na quantidade de ovócitos totais, na quantidade de ovócitos de melhor qualidade e na taxa de clivagem total, em relação às que não continham o implante. Já em relação à produção de blastocistos, os grupos mostraram resultados semelhantes.

Entretanto, CHAUBAL et al. (2007) relataram que a presença de dispositivo de progesterona sintética intra-vaginal, seguido por um protocolo de superovulação para OPU, não apresentou efeito na resposta folicular, sendo que em vacas sem o dispositivo houve aumento no número de blastocistos por cada sessão de aspiração.

GOODHAND et al. (2000) e RAMOS et al. (2010) não observaram melhorias quanto ao número e à qualidade dos ovócitos recuperados ou ao número de embriões produzidos *in vitro*, quando sincronizaram a onda folicular de vacas doadoras para a OPU com implantes de P_4 e associação de benzoato de estradiol (BE).

Segundo TAKUMA et al. (2007) a presença de CL nos ovários não afetou a dinâmica folicular ovariana após a aspiração folicular e nem o desenvolvimento de competente complexo cumulus-ovócito (COC) coletado.

SUGULLE et al. (2008) investigando as taxas de clivagem e o desenvolvimento de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, de ovários com e sem CL, concluíram que a presença de CL não influencia significativamente no desenvolvimento dos blastocistos.

O número de ovócitos viáveis e degenerados, bem como as taxas *in vitro* de maturação, fecundação, clivagem e formação de blastocistos não são diferentes em aspirações foliculares de qualquer fase do ciclo estral, seja inicial ou final, e mesmo da fase luteínica, quando há a presença de CL em um dos ovários (CHIAN et al., 2002).

As pesquisas de MACHATKOVÁ et al. (2000) mostraram que os melhores resultados em todas as etapas da FIV, eram provenientes da aspiração de ovócitos durante a fase de crescimento, ainda na primeira onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, além de haver ausência de CL, pela aplicação de PGF_{2α} para sincronizar o cio. Também MACHATKOVÁ et al. (2004) concluíram que os melhores resultados da produção *in vitro* de embriões ocorrem no início do ciclo estral (dia 3 pós-cio), quando o CL ainda está em formação.

Já MACHATKOVÁ et al. (1996) concluíram que ocorre maior produção *in vitro* de embriões e com maior velocidade de desenvolvimento em blastocistos quando se utiliza ovócitos aspirados no final da fase luteal, de 14 a 16 dias de ciclo estral, ou seja, quando houve predominância de P₄ do CL por maior tempo.

HAZELEGER et al. (1995) descreveram que a concentração de progesterona do fluido folicular era menor naqueles folículos ovarianos cujos ovócitos aspirados eram superiores, em termos de qualidade de ovoplasma, cor, tamanho e *cumulus oophorus*. Os ovócitos superiores apresentaram maior taxa de desenvolvimento *in vitro* de blastocistos. No entanto, não foram encontradas diferenças nas concentrações de estradiol-17β ou de IGF-I no fluido folicular tanto de folículos que produziram ovócitos de qualidade superior quanto inferior.

De acordo com PETYIM et al. (2003) a presença de um CL produzindo P₄ não altera a produção e a qualidade de ovócitos aspirados, no entanto a presença de um folículo dominante diminui o número de ovócitos coletados. Já PETYIM et al. (2000) observaram menor número de folículos emergentes e puncionados, na presença de CL.

ARLOTTO et al. (1996) não encontraram nenhum efeito do estágio do ciclo estral da fêmea doadora sobre os ovócitos maturados *in vitro* e nem sobre os embriões produzidos.

VASSENA et al. (2003a) investigaram a relação da textura folicular obtida por ultrassonografia e a qualidade dos ovócitos recuperados nas diferentes fases do ciclo estral. Eles concluíram que a presença local de um CL ou de um folículo dominante (FD) no ovário não exercem influência na qualidade dos ovócitos e nem na competência na produção de embriões *in vitro*.

VASSENA et al. (2003b) observaram melhores taxas de desenvolvimento de ovócitos em blastocistos, quando aspirados no dia 5 da emergência da onda, ou seja, no período de regressão folicular inicial e não associaram a nenhum efeito local do CL ou do FD.

GONZALEZ-BULNES et al. (2005) comparando ovelhas com presença de CL e sem CL, encontraram resultados semelhantes em relação a folículos disponíveis e qualidade de ovócitos, mas registraram a favor dos animais com CL, maior taxa de fecundação (73,5% vs 45,5%, $p < 0,005$), maior taxa de desenvolvimento de blastocisto (35,8% vs 19,3%, $p < 0,01$), maior número de embriões transferíveis ($7,4 \pm 0,6$ vs $4,1 \pm 0,6$, $p < 0,05$) e maior taxa de eclosão após a vitrificação (80,0% vs 25,0%, $p < 0,05$).

Já CONTRERAS-SOLIS et al. (2008) observaram que a presença de CL no meio da fase luteal, quando a P_4 apresenta maior concentração sérica, proporciona um aumento na população de folículos e consequentemente no número de ovócitos aspirados para FIV.

Quanto à utilização de implante de progestágeno em ovelhas, GONZALEZ-BULNES et al. (2002) descreveram que ocorre um aumento na produção de folículos, bem como no número e qualidade de embriões transferíveis quando há presença de CL durante o protocolo hormonal. No entanto, BERLINGUER et al. (2007) verificaram que o tratamento com progestágeno promoveu menor taxa de ovócitos coletados do que nas ovelhas não tratadas, além de menor taxa de clivagem e menor porcentagem de blastocistos produzidos.

Avaliando os ovários de búfalas com e sem CL, DAS et al. (1996) observaram que a presença do CL reduz significativamente o número de folículos ovarianos, principalmente pela grande ocupação física da gônada. No entanto, ABDOON & KANDIL (2001) notificaram em seus trabalhos, também em búfalas, que a presença do

CL promoveu um efeito positivo naquele ovário, apresentando mais folículos ovarianos na superfície, sendo $5,8 \pm 0,3$ (com CL) e $4,3 \pm 0,2$ (sem CL) folículos por ovário ($p < 0,05$). Eles relataram ainda que, nas búfalas gestantes e nas cíclicas, ou seja, onde há presença de CL ativo, ocorre maior número de ovócitos de boa qualidade, enquanto que nos animais em anestro aparecem mais folículos de pior qualidade e desnudos.

A fase do ciclo estral onde predomina CL e há ausência de folículo dominante (FD) proporciona menor número de folículos atrésicos, beneficiando os resultados da OPU, pois segundo ZEUNER et al. (2003) a apoptose folicular fornece ovócitos de grau 3 ou 4, que são incompetentes para desenvolvimento *in vitro*. No entanto, os líquidos destes folículos apoptóticos não interferem no desenvolvimento *in vitro* dos ovócitos de graus 1 e 2.

O fator negativo da presença do folículo dominante foi também relatado por VARISANGA et al. (1998), que associaram a presença do CL e a ausência do FD como responsáveis por maior quantidade de ovócitos coletados e maiores taxas de clivagem e formação de blastocistos *in vitro*. Também KNOPF et al. (1989) concluíram que a presença de um CL funcional pode exercer efeito sistêmico e local sobre a população de folículos, afetando a dominância exercida pelo FD.

TAKAGI et al. (1998) verificaram que o cisto folicular em vacas, com predominância em seu fluido, de estradiol em excesso ou cronicamente de progesterona, como se fosse um corpo lúteo, não interfere na produção de ovócitos dos folículos pequenos no que se refere ao número de estruturas coletadas, suas morfologias e suas maturações *in vitro*, seja do ovário ipsi ou contra-lateral ao cisto.

DOMÍNGUEZ (1995) relatou que a presença de corpo lúteo, seja comparando animais com e sem CL, ou no próprio animal (ovário com vs sem CL), não afetou o número de folículos a serem aspirados nos ovários. No entanto, quando se comparou vacas gestantes em relação às vacas não gestantes, mas com CL, notou-se maior número de folículos pequenos e menor número de folículos médios e grandes nas gestantes.

MEINTJES et al. (1995) e SAUVÉ (1998) não encontraram problemas operacionais e nem consequências às vacas gestantes, submetidas às seções de OPU.

Vacas no pós-parto recente tendem a produzir ovócitos que alcançam maiores taxas de desenvolvimento em blastocistos, quando cultivados *in vitro*, do que novilhas nulíparas com idades de 12 a 30 meses. Esta característica provavelmente se embasa, no fato dos ovários das vacas já terem se amadurecido e formado corpos lúteos ao longo da vida reprodutiva (RIZOS et al., 2005).

As diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são evidentes. Em animais da raça holandesa predominam-se duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (WOLFENSON et al., 2004), enquanto que em zebuínos ocorre maior incidência de 3 e até 4 ondas de crescimento folicular (VIANA et al., 2000). O número de folículos em cada onda de crescimento folicular é maior em fêmeas *Bos taurus indicus* ($33,4 \pm 3,2$) do que em *Bos taurus taurus* ($25,4 \pm 2,5$), representando uma influência direta na eficiência das técnicas de transferência de embriões e de OPU-PIV e favorecendo as fêmeas zebuínas (BARUSELLI et al., 2007).

No entanto, os diâmetros foliculares de *Bos taurus indicus* são inferiores aos de *Bos taurus taurus*, como também o diâmetro do corpo lúteo. Enquanto o CL de zebuínos apresenta diâmetro de 17 a 21mm, o de taurinos alcança média de 20 a 30mm, proporcionando nas fêmeas zebuínas, menor grama de tecido luteínico e, conseqüentemente, menor concentração de progesterona produzida pelo CL do que nas taurinas (FIGUEIREDO et al., 1997 apud BARUSELLI et al., 2007). DOMÍNGUEZ (1995) também verificou que vacas de raças européias (*Bos taurus taurus*) apresentaram folículos maiores que vacas de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*).

Segundo BONI et al. (1997) o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular é uma característica de alta repetibilidade e por isso apresenta diferenças entre indivíduos.

LUCIANO et al. (2010) estudaram a presença de PGRMC1 (“progesterone receptor membrane component-1”) codificado pelo RNA-m nos ovócitos bovinos, bem como a expressão ou a função deste receptor de membrana sobre os ovócitos durante as fases de maturação, fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. Eles verificaram que estes receptores de progesterona se expressam nos ovócitos mudando a sua localização em estágios específicos de maturação deste gameta, que podem

estar relacionados com o mecanismo pelo qual os cromossomos segregam, e que acabam por promover melhorias nas taxas de maturação ovocitária *in vitro*.

MERTON et al. (2009) estudaram os fatores genéticos que influenciam o resultado da OPU-PIV (aspiração da doadora e produção *in vitro*) e sua relação com a fertilidade feminina, a fim de se introduzir tais características na seleção de doadoras. Eles verificaram que a qualidade do complexo cumulus-ovócito(COC) é independente do número total de COCs coletados por meio de OPU e que, em geral, um maior número de COCs levará a um maior número de embriões produzidos. Concluíram ainda que o maior número de COCs de melhor qualidade é o responsável por maior número de embriões clivados e transferíveis, desde que o sêmen utilizado não atue negativamente.

Quanto às proporções dos sexos dos fetos AVERY et al. (1991) e GUTIERREZ-ADÁN et al. (2001) descreveram que as condições de cultivo dos embriões, associada à escolha de blastocistos de desenvolvimento mais avançado para a inovulação, favoreciam os de sexo masculino, por desenvolverem mais rápido, em detrimento aos do sexo feminino.

3- OBJETIVOS

3.1- Gerais

Este trabalho verificou a influência da presença local ou sistêmica do corpo lúteo, bem como das concentrações séricas de progesterona circulante, sobre:

- a quantidade e qualidade de ovócitos aspirados por *ovum pick-up* (OPU) e,
- a quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*,

em fêmeas bovinas doadoras de ovócitos, da raça Nelore, compostas por fêmeas gestantes e não gestantes, sendo estas últimas submetidas ou não a implantes de progestágenos e aplicação de PGF_{2α}.

3.2- Específicos

Também se verificou a partir dos embriões produzidos:

- as taxas de concepção nas receptoras,
- a proporção do sexo dos fetos diagnosticados aos 60 dias de gestação,
- a relação entre a perda gestacional e a presença de CL no ovário de origem dos ovócitos,
- o lado do ovário em que predominava o CL nas doadoras.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

Os ovócitos foram aspirados de folículos ovarianos de fêmeas bovinas, pelo método de *ovum pick-up* (OPU), ou seja, pela aspiração de ovócitos por meio de punção pelo fórnix vaginal, com auxílio de ultrassonografia. As doadoras eram da raça Nelore, por fazerem parte da maioria do rebanho nacional, sendo todas de alto valor genético e fenotípico.

Os animais destinados à aspiração folicular foram distribuídos em 5 grupos (G), divididos de acordo com a presença de corpo lúteo (CL) em um dos ovários e de acordo com a inserção de implante de progestágeno, da seguinte forma:

G1= fêmeas gestantes com idade gestacional variando de 30 a 240 dias.

G2= fêmeas não gestantes, apresentando CL em um dos ovários e submetidas à manipulação farmacológica do ciclo estral por meio de protocolos à base de progestágenos, em implantes subcutâneos auriculares e com aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

G3= fêmeas não gestantes, submetidas ao mesmo tratamento de G2, mas sem a presença de CL nos ovários.

G4= fêmeas não gestantes, sem tratamento hormonal e com presença de CL em um dos ovários.

G5= fêmeas não gestantes, sem tratamento hormonal e sem presença de CL nos ovários.

Foram realizadas 50 seções de aspiração para cada grupo, totalizando 250 seções ou 500 ovários, padronizando-se as mesmas variações de idade em cada um. As idades variaram de dois a treze anos, sendo a maioria com cinco anos. No total foram utilizadas 219 vacas, sendo que em 198 vacas foi feita apenas uma seção e em 21 vacas foram feitas 52 seções. Estas 21 vacas de múltiplas seções foram distribuídas da seguinte forma, 13 vacas foram submetidas a duas seções em cada uma, seis vacas submetidas a três seções em cada e duas vacas a quatro seções em cada.

As vacas gestantes apresentaram média de 4,17 meses de gestação (30 a 240 dias), sendo que das 50 seções, oito foram realizadas em vacas com 60 dias de prenhez, que foi a idade que mais se repetiu e nenhuma OPU foi realizada em vaca com 180 dias.

Os grupos G2 e G3 que eram compostos por animais submetidos à sincronização do estro, ou de uma onda folicular, foram submetidos ao seguinte protocolo hormonal:

Dia 0= colocação de implante de progestágeno (subcutâneo auricular); aplicação de 2mg (2mL) de benzoato de estradiol intra-muscular (IM) e aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico (2mL de PGF_{2α} sintética, IM).

Dia 5= Retirada do implante de progestágeno e realização da OPU.

Os animais do G3 mesmo não apresentando CL, eram submetidos à aplicação de PGF_{2α}, enquanto que os animais do G2 recebiam a PGF_{2α} objetivando a regressão do CL, possibilitando com isto mais espaço físico para desenvolvimento, detecção e punção dos folículos.

4.2- Local e Período

As aspirações foliculares foram realizadas em fazendas localizadas no Triângulo Mineiro, sendo sete no município de Uberaba e uma no município de Uberlândia. O

período de realização foi de janeiro de 2009 a julho de 2010, com média de 13,15 seções de aspiração por mês.

As etapas da PIV foram realizadas no Laboratório Biovitro, de produção comercial de embriões em Uberaba, Minas Gerais.

4.3- Geral

Nos grupos G1, G2 e G4 havia a necessidade de se separar os ovócitos colhidos de cada ovário, para se quantificar a produção por gônada com ou sem CL. Os ovócitos eram então maturados e fecundados em placas diferentes para cada ovário. Sendo assim, as vacas que teriam os ovócitos divididos para serem fecundados com o sêmen de mais de um touro, foram descartadas do trabalho. As vacas dos grupos G3 e G5 não tiveram seus ovócitos separados por ovário durante a OPU, pois como não havia a presença de CL em nenhuma gônada, não necessitaria comparação. No entanto, para se padronizar todos os grupos, as vacas destes dois grupos, que tinham acasalamento com mais de um touro na mesma aspiração, também não foram utilizadas.

Os ovócitos foram maturados em laboratório por 24 horas, quando então foram fecundados utilizando-se sêmen de touros selecionados de acordo com cada acasalamento. Após a produção *in vitro* os embriões foram classificados, de acordo com a morfologia, em graus I a IV, segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1998), sendo que apenas os de Grau I foram destinados à inovulação, em receptoras com ciclo estral previamente sincronizado e todas avaliadas quanto à capacidade reprodutiva para recebê-los.

Para se evitar ao máximo as variações na execução da pesquisa, as mesmas pessoas trabalharam em todas as etapas, sendo dois veterinários na realização da OPU, dois técnicos na avaliação e seleção dos ovócitos e um veterinário e dois técnicos nos trabalhos dentro do laboratório de PIV, que foi o mesmo em toda a pesquisa. A inovulação dos embriões foi feita por dois veterinários experientes nesta função, enquanto que outros dois veterinários foram responsáveis por todas as etapas de

ultrassonografia nas receptoras, como a seleção das receptoras aptas à inovulação, o diagnóstico de gestação e a sexagem fetal.

Deve-se ressaltar que todo o trabalho foi realizado seguindo-se a metodologia de rotina dos profissionais envolvidos, bem como do laboratório de PIV, havendo apenas alterações em relação aos animais dos grupos G1, G2 e G4. Nestes grupos havia separação dos ovócitos, durante a aspiração, em tubos diferentes para cada ovário, com e sem corpo lúteo. Também a avaliação destes ovócitos era feita em placas diferentes, bem como todo o processo de maturação *in vitro* e depois a fecundação *in vitro*, em gotas separadas por ovários. Já nas etapas de trabalho com os embriões, não houve alteração de rotina, apenas os devidos cuidados nas anotações das inovulações e nos diagnósticos ultrassonográficos para todos os grupos.

Quinze doadoras de cada grupo, ou seja, 30%, foram escolhidas aleatoriamente para se realizar coleta de sangue, via punção venosa, no momento da aspiração folicular, para a dosagem sérica de progesterona. As amostras foram centrifugadas, o soro obtido foi congelado a $-20,0^{\circ}\text{C}$ e identificado quanto ao animal, ao grupo a que pertencia e à data da coleta. O material congelado foi enviado ao Laboratório Hermes Pardini, em Belo Horizonte-MG, e analisado pelo método de Quimioluminescência, com resultados registrados em nanogramas por mililitro (ng/mL).

4.4- Aspiração folicular para obtenção dos ovócitos

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom Aloka SSD500, com transdutor micro-convexo 5MHZ, acoplado em uma guia de aspiração trans-vaginal. As aspirações foram realizadas com agulha hipodérmica descartável 20G (Jelco Plus) e sistema de aspiração Handle Cook. Foi utilizada uma bomba de vácuo da marca Handle Cook e a pressão de vácuo/vazão foi ajustada previamente em 18mL /minuto.

Antes de cada OPU foi realizada anestesia epidural com 3mL da associação de cloridrato de lidocaína 2% (2,5 mL) com cloridrato de xilazina 0,1% (0,5 mL). Após a higienização da região perineal com água, a guia de aspiração acoplada com o

transdutor do ultrassom (US) foi inserida até o fórnix vaginal de cada lado correspondente ao ovário. Com o auxílio de manipulação trans-retal os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e a bomba de vácuo era acionada iniciando as aspirações dos folículos. Este procedimento foi realizado em todos os folículos acima de 2mm visualizados em cada ovário. Os ovócitos foram aspirados e posteriormente avaliados para se obter a porcentagem de viáveis. O meio de aspiração e lavagem do sistema era composto de PBS (Phosphate-buffered saline), heparina sódica (5.000 UI/L) e soro fetal bovino (10mL/L).

4.5- Lavagem, Seleção e Transporte dos ovócitos

O material aspirado era imediatamente avaliado na própria fazenda, para seleção dos ovócitos viáveis. A lavagem do líquido aspirado era feita com o mesmo meio utilizado para a aspiração até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. O sedimento restante era depositado em placas de Petri de 60mm para procura e seleção dos ovócitos. Posteriormente era efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos ovócitos recuperados em Grau I, II, III, IV e desnudo, segundo DE LOOS et al. (1991), onde:

Grau I: revestimento com multicamadas de cumulus compacto, ovoplasma homogêneo e complexo cumulus-ovócito claro e transparente;

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

Grau III: pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas) e ovoplasma irregular com picnose;

Grau IV ou atrésico: cumulus expandido com células escuras e em grumos e complexo cumulus-ovócito escuro e irregular;

Desnudo: sem camadas do cumulus e com ovoplasma uniforme ou com granulações.

Após a avaliação os ovócitos classificados como viáveis que eram GI, GII e GIII, eram transportados ao laboratório, sendo descartados os atrésicos e os desnudos.

4.6- Maturação *in vitro* dos ovócitos (MIV)

Os ovócitos de graus I, II e III eram 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®, Hertape 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 (BAVISTER et al., 1992 e DONNAY et al. 1997).

4.7- Fecundação *in vitro* dos ovócitos (FIV)

O sêmen utilizado não foi padronizado na pesquisa por ser produção comercial de embriões. Foram utilizadas palhetas de sêmen convencional, não sexado, de diversos touros da raça Nelore, de acordo com os acasalamentos prévios, mas todos com históricos conhecidos e favoráveis na FIV. Nos grupos G1, G2 e G4 cada dose era dividida entre as placas com ovócitos oriundos de cada ovário, com CL e sem CL, separadamente. Não foram utilizados, em nenhum dos cinco grupos, ovócitos de animais cuja fecundação se daria com mais de um touro, escolhido naquele acasalamento.

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em gotas de 70µL 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 (BAVISTER et al., 1992 e PARRISH et al., 1986).

O sêmen congelado em palhetas de 0,25mL ou 0,5mL foi aquecido em água a 35,0°C por 30 segundos e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a 1600 rpm por 30 minutos, em meio TALP-sêmen [meio TALP

com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)] de acordo com PARRISH et al. (1986).

Eram recuperados 30µL do sedimento e avaliados quanto à concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides móveis/mL com meio TALP-FIV sob óleo mineral. Posteriormente, 8 µL do sêmen diluído eram adicionados às gotas contendo 30 ovócitos, obtendo-se a concentração final de 2×10^5 espermatozóides vivos/gota, resultando em torno de 7×10^3 espermatozóides por ovócito. No caso das vacas onde haviam poucos ou apenas um ovócito viável para ser fecundado, era colocada esta concentração (7×10^3 espermatozóides por ovócito) em uma única gota, mas em uma placa com mais gotas e mais ovócitos. No total eram colocadas seis gotas em cada placa. O período de co-incubação foi de 20 a 24h, em incubadora à temperatura de 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4.8- Cultivo *in vitro* dos zigotos (CIV)

Após o término da incubação com os espermatozóides, os zigotos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento em placas de 35 mm com 90 µL de meio SOF, cobertos com óleo mineral, atmosfera de 5% de CO₂ em ar, sob umidade saturada e mantidos no interior da incubadora de cultivo à temperatura de 38,5°C, durante sete dias (GARDNER et al., 1994 e HOLM et al., 1999), até atingirem o estágio de blastocisto, sendo o dia zero, o dia da fecundação.

A taxa de clivagem era avaliada aproximadamente 72 horas após a fecundação *in vitro*, em microscópio estereoscópico (aumento de 50×), onde os embriões de 16 e 32 células eram considerados clivados. No sétimo dia após a fecundação *in vitro* era avaliada a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e então os embriões eram classificados em viáveis para a inovulação, ou seja, de grau I, ou inviáveis e, portanto, descartados.

Os embriões de sete dias eram envasados em palhetas de 0,25mL em meio de TE e entregues ao veterinário responsável por realizar a inovulação, sempre um em

cada palheta. Para se ter o controle dos grupos, bem como dos ovários com ou sem CL, dos quais se originaram os embriões, os mesmos eram codificados no laboratório e posteriormente associados às receptoras em que foram inovulados, para futuramente se diagnosticar taxa de prenhez e sexo do produto. Todos os embriões grau I produzidos foram inovulados.

4.9- Inovulação dos embriões

As receptoras utilizadas eram de raças mestiças de zebuínos×taurinos, de fazendas inseridas nos programas do laboratório de PIV, com resultados negativos nos exames de brucelose e tuberculose e vacinações contra leptospirose e IBR/BVD (rinotraqueíte infecciosa bovina / diarreia viral bovina). O implante dos embriões (inovulação) foi feito pelo método não cirúrgico (transcervical) utilizando-se aplicador IMV. Foram utilizados apenas embriões frescos, produzidos *in vitro*, de grau I, sem extrusões de células e de coloração homogênea. As receptoras foram submetidas à sincronização de cio, sendo todas tratadas com o mesmo protocolo, que constava de:

Dia 0= colocação de implante de progestágeno (subcutâneo auricular) e aplicação de 2mg (2mL) de benzoato de estradiol (IM).

Dia 5 = aplicação de 300UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina, IM)

Dia 8= Retirada do implante de progestágeno e aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico (2mL de PGF_{2α} sintética) (IM).

Dia 9= Aplicação de 1mg (1mL) de benzoato de estradiol (IM).

Dia17= Inovulação do embrião de PIV.

A inovulação foi realizada sete dias após a fecundação, pelo método não-cirúrgico, no ápice do corno uterino ipsilateral ao ovário com a presença de CL.

As aspirações foliculares nas vacas doadoras foram feitas sempre no dia 9 do protocolo das receptoras e a fecundação *in vitro*, no dia 10.

Trinta dias após a fecundação *in vitro*, ou seja, 23 dias após a inovulação, foi feito o exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação nas receptoras. Trinta

dias depois, as receptoras prenhes foram novamente avaliadas por ultrassonografia, para diagnóstico do sexo fetal.

4.10- Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foi feita a Análise de Variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Tukey para comparação entre médias, a 5% de significância. As análises foram feitas pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

Para comparação de proporção de sexos dentro e entre os grupos, foi utilizado o teste de comparação múltipla de proporções, utilizando o software R (2008) de acordo com BIASE & FERREIRA (2009).

O coeficiente de variação (CV) definido como o desvio-padrão em porcentagem da média, é uma medida de dispersão que se presta para a comparação de distribuições diferentes. Ele tem a vantagem de permitir a comparação da precisão entre experimentos, sem a necessidade de igualdade de unidades, sendo que o número de repetições influi nos valores de CV (PIMENTEL-GOMES, 1991). Em todas as tabelas foi colocado o valor de CV em porcentagem, para se demonstrar o quanto algumas médias que aparentemente pelos números parecem diferentes, não o são pelo teste de Tukey.

4.10.1- Descrição das variáveis analisadas

As variáveis analisadas no trabalho foram ovócitos totais aspirados, porcentagem de ovócitos viáveis, taxa de embriões viáveis produzidos, taxa de prenhez de embriões inovulados, porcentagem de fêmeas e machos após a sexagem fetal e concentração sérica de progesterona.

A quantidade de ovócitos aspirados totais reflete a quantidade de folículos antrais que se apresentavam na superfície de cada ovário para serem puncionados.

A taxa de ovócitos viáveis é a porcentagem dos ovócitos com características superiores, classificados como GI, GII e GIII, que seriam capazes de se tornarem

embriões em relação ao número total de ovócitos aspirados. Todos estes ovócitos considerados viáveis foram colocados na incubadora para maturação e fecundação *in vitro*.

A produção de embriões viáveis analisada foi toda de embrião de grau I, que apresentam maiores chances de produzir prenhez e que, portanto, é destinada à inovulação em receptoras de embriões. Esta taxa foi avaliada em relação à quantidade total de ovócitos colocados na incubadora para maturação e fecundação *in vitro*.

A taxa de prenhez obtida representava o número de receptoras que ficaram gestantes em relação ao número total de embriões inovulados. Todos os embriões de grau I produzidos foram transferidos, sempre um para cada receptora.

A proporção do sexo dos fetos foi avaliada por meio da sexagem fetal por ultrassonografia, aos 60 dias pós-fecundação. As comparações foram feitas apenas entre os grupos, em cada tratamento.

A concentração de progesterona sérica foi avaliada em análises de soro de 15 animais por grupo, para se verificar possíveis diferenças entre as concentrações deste hormônio entre os grupos. De posse destes valores foram feitas as análises de ovócitos, embriões, prenhez e sexo dos fetos, para cada grupo em relação à sua concentração de P_4 .

5- RESULTADOS

As variáveis descritas no trabalho foram analisadas em várias situações de comparação entre os grupos, que foram divididos da seguinte forma: todos os cinco grupos conjuntamente; os três grupos que possuíam corpo lúteo, onde foram comparados inclusive o ovário com CL e o sem CL; os dois grupos que não possuíam CL e todos os grupos em relação à concentração de progesterona. Foram aspirados 8588 ovócitos totais dos 500 ovários, das 250 seções de aspiração do experimento, resultando em uma média de 17,17 ovócitos por ovário.

5.1- Avaliação de todos os grupos conjuntamente

Quando se analisou estatisticamente a produção de ovócitos aspirados, observou-se que o grupo G4 apresentou maior média ($p < 0,05$) do que os grupos G2 e G3, ficando os grupos G1 e G5 iguais a todos (Tab. 1).

Tabela 1- Médias de produção e qualidade de ovócitos, de embriões produzidos *in vitro* e taxa de prenhez de todos os grupos, oriundos de animais da raça Nelore.

Grupos	Média de Ovócitos aspirados	Ovócitos viáveis (%)	Embriões viáveis (%)	Taxa de Prenhez (%)
G1	31,34 ($\pm 20,20$) ab	80,29 ($\pm 12,40$) a	38,51 ($\pm 21,70$) a	30,81 ($\pm 24,88$) a
G2	29,40 ($\pm 20,33$) a	82,16 ($\pm 11,85$) a	36,17 ($\pm 21,06$) a	36,48 ($\pm 26,66$) a
G3	26,58 ($\pm 21,24$) a	78,27 ($\pm 17,36$) a	29,49 ($\pm 22,61$) a	37,93 ($\pm 30,79$) a
G4	44,08 ($\pm 32,98$) b	81,02 ($\pm 11,78$) a	32,00 ($\pm 20,84$) a	32,92 ($\pm 28,23$) a
G5	40,36 ($\pm 34,25$) ab	83,39 ($\pm 11,28$) a	29,64 ($\pm 19,39$) a	35,20 ($\pm 29,21$) a
CV(%)	77,39	16,20	63,77	80,86

Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

Ao se comparar a porcentagem de ovócitos viáveis para serem maturados e fecundados, a taxa de embriões considerados viáveis para a inovulação, ou seja, embriões de grau I e a taxa de prenhez aos 30 dias de gestação, os grupos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

Quanto à proporção do sexo fetal, observou-se que a produção de fêmeas e de machos foi semelhante ($p > 0,05$) tanto entre como dentro dos grupos (Tab. 2).

A média geral de aborto foi 2,78% (25 em 898 prenhez). No grupo G1 houve um total de 1,45% (2/138) de abortos, sendo 1,47% (1/68) oriundos dos ovários com CL e 1,43% (1/70) dos ovários sem CL. No G2 a média de aborto foi de 2,89% (5/173), sendo 3,81% (4/105) de produtos do ovário com CL e 1,47% (1/68) do ovário sem CL. No G4 a média de aborto foi de 3,21% (7/218) sendo 4,48% (6/134) do ovário com CL e 1,19% (1/84) do ovário sem CL. Nos grupos onde não havia CL as taxas de aborto foram 3,10% (4/129) no G3 e 2,92% (7/240) no G5.

Tabela 2- Números totais de ovócitos aspirados e viáveis, de embriões produzidos in vitro, de prenhez aos 30 dias, de abortos e número e proporção de cada sexo aos 60 dias, em todos os grupos.

Grupos	Ovócitos aspirados	Ovócitos viáveis	Embriões viáveis	Prenheses	Abortos	Fêmeas (%)	Machos (%)
G1	1567	1283	439	138	2	73 (53,68) a,A	63 (46,32) a,A
G2	1470	1243	429	173	5	78 (46,43) a,A	90 (53,57) a,A
G3	1329	1091	308	129	4	70 (56,0) a,A	55 (44,0) a,A
G4	2204	1835	592	218	7	114 (54,03) a,A	97 (45,97) a,A
G5	2018	1682	544	240	7	122 (52,36) a,A	111 (47,64) a,A

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de comparação múltipla de proporções, com 5% de significância.

5.2- Avaliação dos grupos com presença de CL em um dos ovários

Os grupos com a presença de CL em um dos ovários, que são G1, G2 e G4, foram analisados separadamente dos grupos sem CL, para se verificar a influência da presença local do CL em um ovário, relacionando os grupos entre si e dentro de cada um, a ponto de se verificar a produção dos ovários separadamente (Tab. 3).

Tabela 3- Números totais de ovócitos aspirados e viáveis, de embriões produzidos e de prenhez dos ovários com e sem CL dos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Ovócitos totais aspirados	Ovócitos viáveis	Embriões viáveis	Prenhez
G1 com CL	752	589	220	68
G1 sem CL	815	694	219	70
G2 com CL	703	612	251	105
G2 sem CL	767	631	178	68
G4 com CL	1086	909	346	134
G4 sem CL	1118	926	246	84

Conforme mostra a Tabela 4, o grupo G4 produziu maior número ($p < 0,05$) de ovócitos recuperados nos ovários com e sem CL, bem como na somatória dos dois ovários, quando comparado com os grupos G1 e G2. Porém quando se comparou dentro de cada grupo, os ovários com CL e sem CL forneceram quantidades iguais de ovócitos aspirados ($p > 0,05$). A presença de CL em um dos ovários não propiciou

diferença ($p>0,05$) na quantidade de ovócitos aspirados para cada grupo individualmente (16,94 vs 18,00).

Tabela 4- Médias de ovócitos aspirados do ovário com CL, do sem CL e dos dois ovários, nos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Média de ovócitos aspirados	Ovócitos aspirados de ovários com CL	Ovócitos aspirados de ovários sem CL
G1	15,67 a	15,04 ($\pm 9,56$) a,A	16,30 ($\pm 11,04$) a,A
G2	14,70 a	14,06 ($\pm 9,84$) a,A	15,34 ($\pm 10,52$) a,A
G4	22,04 b	21,72 ($\pm 16,65$) b,A	22,36 ($\pm 16,58$) b,A
CV (%)	72,89		
Ovários com CL	16,94 x		
Ovários sem CL	18,00 x		

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

A aplicação de PGF_{2 α} no G2 para promover a luteólise e com isto maior espaço para as aspirações foliculares, não resultou em maior quantidade de ovócitos aspirados ($p>0,05$), pois o G2 produziu igualmente a G1 e bem menos que G4, que tiveram seus corpos lúteos intactos.

A Tabela 5 demonstra a avaliação dos ovócitos pós-aspiração, em que foi verificada a quantidade de ovócitos que se apresentavam viáveis para serem maturados e fecundados *in vitro*, em relação ao número de ovócitos totais que foram aspirados, sendo os valores dados em porcentagem.

Tabela 5- Médias das taxas de ovócitos viáveis (graus I, II e III) após a aspiração, do ovário com CL, do sem CL e dos dois ovários, nos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Ovócitos viáveis (%)	Ovócitos viáveis – com CL (%)	Ovócitos viáveis – sem CL (%)
G1	79,92 a	77,03 ($\pm 14,00$) a,A	82,82 ($\pm 15,47$) a,B
G2	82,30 a	84,90 ($\pm 13,97$) b,A	79,71 ($\pm 14,59$) a,A
G4	81,18 a	82,16 ($\pm 12,98$) ab,A	80,20 ($\pm 14,04$) a,A
CV (%)	17,49		
Ovários com CL	81,36 x		
Ovários sem CL	80,91 x		

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV= Coeficiente de Variação.

Nesta característica de ovócitos viáveis, os três grupos foram similares na produção total, no entanto o G2 produziu maior porcentagem do ovário com a presença de CL do que G1 ($p<0,05$), sendo G4 igual aos outros dois grupos. Estes valores

indicam que mesmo G2 produzindo a mesma quantidade que G1 no ovário com CL, como visto na Tabela 4, ele produziu maior qualidade de ovócitos.

Já no ovário sem o CL não houve diferença entre os três grupos. Ao se analisar dentro de cada grupo individualmente, apenas no G1 é que houve diferença entre o ovário com e o sem CL, onde o sem CL produziu mais ovócitos viáveis ($p < 0,05$). Quando se analisou os três grupos em conjunto, a presença do CL em um dos ovários não propiciou diferença na porcentagem de ovócitos viáveis que foram aspirados (81,36% vs 80,91%).

Analisando-se a porcentagem de embriões grau I (de melhor qualidade) produzidos a partir dos ovócitos colocados para a fecundação, observa-se na Tabela 6 que nestes três grupos a presença de CL em um dos ovários propiciou maior produção de embriões (40,93% vs 31,63%, $p < 0,05$).

Tabela 6- Médias das taxas de embriões viáveis produzidos *in vitro*, originários de ovócitos do ovário com CL, do sem CL e dos dois ovários, nos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Embriões viáveis (%)	Embriões viáveis – com CL (%)	Embriões viáveis – sem CL (%)
G1	39,93 a	42,44 ($\pm 24,50$) a,A	37,42 ($\pm 27,58$) a,A
G2	36,50 a	41,33 ($\pm 24,98$) a,A	31,67 ($\pm 20,89$) ab,B
G4	32,41 a	39,01 ($\pm 26,48$) a,A	25,80 ($\pm 19,99$) b,B
CV (%)	66,79		
Ovários com CL	40,93 x		
Ovários sem CL	31,63 y		

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

Analisando-se os três grupos em conjunto, observou-se que os ovários com CL produziram porcentagens de embriões similares entre os grupos ($p > 0,05$), o que não ocorreu nos ovários sem CL, onde o G1 (37,42%) produziu maior porcentagem ($p < 0,05$) de embriões do que G4 (25,80%), enquanto G2 (31,67%) produziu quantidades iguais aos outros dois grupos ($p > 0,05$).

Avaliando-se os grupos individualmente, nos grupos G2 e G4 os ovários com CL (41,33% e 39,01%) produziram mais embriões ($p < 0,05$) do que os ovários sem CL (31,67% e 25,80%), mas no G1 não houve diferença entre os ovários com e sem CL ($p > 0,05$).

As taxas de prenhez diagnosticadas nas receptoras, 23 dias após a inovulação dos embriões, ou 30 dias de gestação (Tab. 7), não variou em nenhum grupo e nem foi influenciada pela presença ou não do CL em um dos ovários ($p>0,05$). Ou seja, a gestação depende de outros fatores após a produção do embrião *in vitro* que não mais a situação ovariana da doadora.

Tabela 7- Médias das taxas de prenhez em receptoras inovuladas com embriões originários de ovócitos do ovário com CL, do sem CL e dos dois ovários das doadoras, nos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Taxa de Prenhez (%)	Taxa de Prenhez – com CL (%)	Taxa de Prenhez – sem CL (%)
G1	30,54 a	30,46 ($\pm 27,92$) a,A	30,62 ($\pm 27,77$) a,A
G2	36,10 a	40,68 ($\pm 31,33$) a,A	31,50 ($\pm 30,32$) a,A
G4	31,51 a	36,13 ($\pm 29,41$) a,A	26,88 ($\pm 29,16$) a,A
CV (%)	89,71		
Ovários com CL	35,76 x		
Ovários sem CL	29,67 x		

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

Em relação ao sexo dos fetos, os grupos G1, G2 e G4 (Tab. 8) não apresentaram diferenças na produção de fetos do sexo feminino e nem do masculino, em relação aos ovários com CL e sem CL e nem houve diferença entre machos e fêmeas dentro de cada grupo ($p>0,05$).

Tabela 8- Proporção dos sexos de fetos originários das prenhez do ovário com CL e do sem CL, das doadoras dos grupos G1, G2 e G4.

Grupos	Fêmeas	Machos	Total de prenhez aos 60 dias
G1 com CL	36 (53,73%) a,A	31 (46,27%) a,A	67
G1 sem CL	37 (53,62%) a,A	32 (46,38%) a,A	69
G2 com CL	47 (46,53%) a,A	54 (53,47%) a,A	101
G2 sem CL	31 (46,27%) a,A	36 (53,73%) a,A	67
G4 com CL	71 (55,47%) a,A	57 (44,53%) a,A	128
G4 sem CL	43 (51,81%) a,A	40 (48,19%) a,A	83

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de comparação múltipla de proporções, com 5% de significância.

O fato de não ter havido diferença entre a produção de fêmeas e de machos entre os grupos G1, G2 e G4, confirma que não há interferência do CL do ovário em que o ovócito foi aspirado, na fecundação pelo espermatozóide X ou Y.

5.3- Avaliação dos grupos sem a presença de CL nos ovários

Os grupos sem a presença de CL em ambos os ovários, que são G3 e G5, foram analisados separadamente dos grupos com CL, para se verificar alguma semelhança nas suas produções (Tab. 9), visto que são vacas não gestantes e sem atividade cíclica ovariana, mas que se tornaram diferentes pelo fato de que, os animais do G3 tiveram a inserção de implantes de progestágenos por cinco dias até a OPU. Neste caso não haveria influência ovariana local da P_4 , mas poderia haver influência sistêmica deste hormônio.

Tabela 9- Médias de produção e qualidade de ovócitos, de embriões e taxa de prenhez dos grupos G3 e G5.

Grupos	Média de ovócitos aspirados	Ovócitos viáveis (%)	Embriões viáveis (%)	Taxa de Prenhez (%)
G3	26,58 ($\pm 21,24$) a	78,27 ($\pm 17,36$) a	29,49 ($\pm 22,61$) a	37,93 ($\pm 30,79$) a
G5	40,36 ($\pm 34,25$) b	83,39 ($\pm 11,28$) a	29,64 ($\pm 19,39$) a	35,20 ($\pm 29,21$) a
CV (%)	85,15	18,11	71,25	82,08

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

Nestes dois grupos, mesmo não havendo CL em nenhum dos ovários, houve algumas diferenças. Apesar de não estar ciclando, o grupo G3 foi estimulado com protocolo hormonal à base de progestágeno, mas mesmo assim não obteve maior concentração de P_4 sérica (Tab. 10) e ainda produziu menos ovócitos aspirados ($p < 0,05$), representando menor recrutamento folicular.

Ao se comparar a porcentagem de ovócitos viáveis para serem maturados e fecundados, a porcentagem de embriões considerados viáveis para a inovulação (grau I) e a porcentagem de prenhez aos 30 dias de gestação, estes dois grupos G3 e G5, que não possuíam CL, apresentaram resultados semelhantes ($p > 0,05$).

Em relação ao sexo dos fetos, estes dois grupos não apresentaram diferenças ($p>0,05$) de nenhum sexo entre eles e nem entre os dois sexos dentro dos grupos, conforme apresentado anteriormente na Tabela 2.

5.4- Avaliação dos grupos em relação à concentração de progesterona sérica

Para a análise da concentração sérica de P_4 foram obtidos os dados de 30% de animais de cada grupo, num total de 15 vacas, escolhidas aleatoriamente antes das coletas. Os dados foram comparados entre os grupos para saber se houve influência dos níveis séricos de P_4 sobre a produção de folículos a serem puncionados, a qualidade dos ovócitos aspirados, a produção de embriões e a taxa de prenhez 30 dias após a inovulação (Tab. 10).

Tabela 10- Médias de produção e qualidade de ovócitos, de embriões e taxa de prenhez de todos os grupos, em relação à concentração sérica de progesterona.

Grupos	Concentração de P_4 (ng/mL)	Ovócitos aspirados	Ovócitos viáveis (%)	Embriões viáveis (%)	Taxa de Prenhez (%)
G1	18,47 ($\pm 4,97$) a	36,73 ($\pm 23,46$) a	82,93 ($\pm 11,29$) a	40,15 ($\pm 21,18$) a	25,95 ($\pm 19,27$) a
G2	1,53 ($\pm 1,31$) c	38,33 ($\pm 24,30$) a	84,08 ($\pm 8,38$) a	32,63 ($\pm 17,31$) a	42,95 ($\pm 30,06$) a
G3	2,80 ($\pm 2,40$) c	30,93 ($\pm 29,53$) a	71,66 ($\pm 20,08$) a	35,40 ($\pm 30,23$) a	34,64 ($\pm 34,99$) a
G4	8,40 ($\pm 1,81$) b	51,40 ($\pm 25,52$) a	83,37 ($\pm 6,50$) a	29,87 ($\pm 16,17$) a	27,91 ($\pm 19,77$) a
G5	0,95 ($\pm 0,40$) c	40,20 ($\pm 18,98$) a	80,32 ($\pm 12,22$) a	24,77 ($\pm 20,19$) a	21,75 ($\pm 21,43$) a
CV(%)	42,86	62,24	15,65	66,32	84,48

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 5% de significância.

CV = Coeficiente de Variação.

O grupo G1, de vacas gestantes, apresentou a maior concentração sérica de progesterona com média de 18,47ng/mL. A média da idade gestacional destas 15 vacas selecionadas para análise de P_4 foi de 3,4 meses. O grupo G4, que se caracterizou pela presença de CL em vacas vazias e sem serem submetidas ao protocolo de sincronização de estro, apresentou a segunda maior concentração sérica com

8,40ng/mL. Já os grupos G2, G3 e G5 apresentaram igualmente as menores concentrações de P_4 com valores de 1,53, 2,80 e 0,95ng/mL, respectivamente. Estas baixas concentrações foram provavelmente devido à luteólise promovida no G2, que possuía um CL e à ausência de CL no G3 e no G5.

Considerando os animais avaliados pela concentração de P_4 , observou-se que não houve diferença estatística entre todos os grupos na média de ovócitos aspirados ($p>0,05$), não havendo, portanto, influência da concentração de progesterona sérica na produção de folículos. As outras variáveis também se mantiveram estatisticamente similares. Estes resultados mostrados na Tabela 10, onde se avaliou apenas 30% dos animais, se confrontados com os da Tabela 1, em que se avaliou 100% deles, mostram que mesmo com diferenças nas concentrações de P_4 , os dados importantes como qualidade de ovócitos e qualidade de embriões se mantiveram semelhantes entre os cinco grupos ($p>0,05$).

As proporções de fêmeas e de machos nesta parcela de doadoras também foram similares entre os cinco grupos, não havendo influência da P_4 sérica da doadora sobre a fecundação do ovócito *in vitro*, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11- Proporção dos sexos dos fetos de todos os grupos, referentes aos animais submetidos à análise da concentração sérica de progesterona

Grupos	Fêmeas	Machos	Total de prenhez aos 60 dias
G1	25 (53,19%) a,A	22 (46,81%) a,A	47
G2	31 (45,59%) a,A	37 (54,41%) a,A	68
G3	17 (53,12%) a,A	15 (46,88%) a,A	32
G4	32 (55,17%) a,A	26 (44,83%) a,A	58
G5	20 (54,05%) a,A	17 (45,95%) a,A	37

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de comparação múltipla de proporções, com 5% de significância.

As taxas de aborto destes animais foram 0% (0/47) para o G1, 1,45% (1/69) para o G2, 3,03% (1/33) para o G3, 1,69% (1/59) para o G4 e 2,63% (1/38) para o G5.

5.5- Avaliação geral dos resultados

Avaliando-se o lado em que se encontrava o ovário com o corpo lúteo, registrou-se que no G1 o ovário direito (OD) apresentou o CL em 54% dos animais, ou seja, 27 das 50 vacas e o ovário esquerdo (OE) em 46%, ou 23 das 50 vacas, sendo todas as gestações ipsilaterais ao CL. O G2 apresentou 82% (41/50) do CL no OD e 18% (09/50) no OE. O G4 apresentou 74% (37/50) no OD e 26% (13/50) no OE. Na somatória dos três grupos o OD apresentou-se com o CL em 70% (105/150) das vacas e o OE em 30% (45/150).

Os fatores que teoricamente sofrem menos variáveis extrínsecas à doadora seriam os números de ovócitos coletados, a qualidade destes ovócitos, ou seja, a taxa de ovócitos viáveis para a fecundação *in vitro* e ainda, a produção de embriões *in vitro*, considerados viáveis para a inovulação, ou seja, os de grau I.

Na análise destes três fatores acima citados e detalhando-se apenas as variáveis que demonstraram diferenças estatísticas, verificou-se que ao comparar todos os cinco grupos, o G4 produziu, na média por seção de OPU, mais ovócitos totais (44,08) que G2 (29,40) e G3 (26,58) ($p<0,05$), mas se manteve igual a G1 (31,34) e a G5 (40,36) ($p>0,05$).

Avaliando-se agora somente os três grupos com presença de CL em um dos ovários, verificou-se que o G4 (22,04) produziu maior média de ovócitos recuperados por ovário ($p<0,05$) do que G1 (15,67) e G2 (14,70) e inclusive esta superioridade se repete em ovário com e sem CL entre eles (Tab. 4). Porém quando se analisa dentro de cada grupo, não há diferença do ovário com e sem CL ($p>0,05$).

Em relação à qualidade dos ovócitos entre estes três grupos que apresentavam CL, a diferença encontrada foi apenas uma superioridade do G2 (84,90%) sobre o G1 (77,03%), mas ambos iguais ao G4 (82,16%) no ovário com CL, mas nenhuma diferença no ovário sem CL. Já o G1 foi o único grupo que apresentou diferença na porcentagem de ovócitos viáveis entre seus dois ovários, onde o ovário sem CL produziu mais que o com CL (82,82% vs 77,03%, $p<0,05$).

Ainda em relação a estes três grupos, fazendo-se uma análise na produção de embriões viáveis, verificou-se no geral que, os ovários com a presença de CL produziram mais que os sem CL (40,93% vs 31,63%, $p < 0,05$). Na análise individual dos grupos, esta superioridade na produção de embriões do ovário com CL sobre o sem CL, foi vista nos grupos G2 e G4, mas não no G1. No G1 houve superioridade em relação ao G4, na produção de embriões do ovário sem CL.

Os grupos G3 e G5, que não possuíam CL, quando comparados entre si, apresentaram uma superioridade do G5 sobre o G3 somente em relação a maior quantidade de ovócitos aspirados (40,36 vs 26,58, $p < 0,05$).

Analisando-se os cinco grupos, mas de forma individual, notou-se que as proporções de machos e de fêmeas dentro de cada grupo se mantiveram nas médias de nascimentos normais de monta natural, que podem chegar até a 60% de machos ou de fêmeas.

6. DISCUSSÃO

REIS et al. (2002) trabalhando com novilhas da raça Simental não gestantes e com CL, compararam dois momentos do ciclo estral para as aspirações, sendo no 15º dia, onde o CL está bem funcional e no 21º dia, em que o CL está sem função e encontraram maior concentração de P_4 para as aspirações no 15º dia ($6,6 \pm 0,48$ ng/mL vs $3,9 \pm 0,53$ ng/mL com $p < 0,001$) e maior número de ovócitos coletados ($7,2 \pm 0,47$ vs $5,7 \pm 0,44$, $p < 0,05$) do que no 21º dia, respectivamente. No entanto não houve diferença na porcentagem de ovócitos viáveis ($55 \pm 3\%$ vs $47 \pm 3\%$, $p > 0,05$) e na produção de embriões ($24 \pm 3\%$ vs $26 \pm 4\%$, $p > 0,05$), respectivamente. Neste trabalho os grupos que poderiam ser comparados aos dados de REIS et al. (2002) seriam o G4, onde o CL está funcional e o G5 que não possui CL. Desta forma, se encontrou diferença apenas na concentração de P_4 (8,40 ng/mL e 0,95 ng/mL, respectivamente), mas não na quantidade de ovócitos coletados (44,08 vs 40,36, $p > 0,05$). Também, como aqueles autores citaram, não houve diferença na porcentagem de ovócitos viáveis (81,02% vs 83,39%, $p > 0,05$) e na produção de embriões (32,00% vs 29,64%, $p > 0,05$), respectivamente.

Os dados deste trabalho, conforme descritos anteriormente, em relação a G4 e G5, confirmam que não houve diferença estatística a favor do grupo com CL, discordando dos trabalhos de REIS et al. (2006), que relataram em bovinos da raça Holstein Friesian, a presença do CL como fundamental para melhorar as características avaliadas na PIV, em relação aos animais em fase folicular, mas sem CL. Estes autores encontraram maior número de ovócitos coletados dos dois ovários ($10,87 \pm 1,01$ vs $7,05 \pm 0,91$, $p < 0,001$), maior porcentagem de ovócitos viáveis (62,28% vs 54,46%, $p < 0,05$), mais zigotos que clivaram (59,03% vs 45,52%, $p < 0,05$) e maior número de embriões aos sete dias após a FIV (44,23% vs 31,48%, $p < 0,05$), para os grupos com CL em relação aos sem CL, respectivamente.

Ainda se comparando os grupos G4 e G5, onde a presença de um CL não influenciou sistemicamente os ovários em relação ao grupo sem CL, os resultados deste trabalho discordam dos de MANJUNATHA et al. (2007) que encontraram, em ovários de abatedouro, maiores taxas de clivagem (57,0% vs 43,6%, $p < 0,05$) e de embriões transferíveis (19,4% vs 8,8%, $p < 0,05$) em ovários que continham CL, com ou sem FD, em relação aos ovários sem CL e sem FD, respectivamente.

MACHATKOVÁ et al. (1996) também encontraram maior produção de embriões ($p < 0,05$) em animais da raça Holstein, onde havia presença do CL (14 a 16 dias do ciclo estral) com 24,3%, contra 12,16% dos animais onde o CL não havia se consolidado, ou estava ausente.

Entretanto, existem artigos de outros autores que não ressaltam a presença do CL como sendo importante para as características de produção *in vitro* de embriões, quando comparados com animais que não o possui. MACHATKOVÁ et al. (2000) encontraram mais ovócitos viáveis ($p < 0,05$) em doadoras da raça Holstein de 1 a 3 dias de ciclo estral ($8,0 \pm 0,6$) do que em 14 a 16 dias do ciclo ($3,3 \pm 0,5$), onde predominava o CL. Também MACHATKOVÁ et al. (2004) relataram que em bovinos da raça Holstein os melhores ovócitos foram obtidos de ovários em que o CL ainda estava em formação, por volta do dia 3 pós-cio, não sendo importante a presença de um CL funcional para melhorar a qualidade ovocitária. Eles encontraram taxas de produção de embriões de 30,3% e 14,9% ($p < 0,01$) em ovários sem e com CL, respectivamente. Neste trabalho,

os resultados dos animais com presença de CL não chegaram a ser piores em relação aos sem CL, como estes autores descreveram, mas foram semelhantes.

CHIAN et al. (2002) não encontraram diferença ($p>0,05$) em número de ovócitos coletados (22,7 com CL vs 26,05 sem CL) e nem na produção de embriões (30,4% com CL vs 30,2% sem CL) em taurinos. Neste trabalho os números de embriões foram bem semelhantes ao de CHIAN et al. (2002), sendo 32,00% com CL (G4) e 29,64% sem CL (G5). DOMÍNGUEZ (1995) também concluiu que a presença de CL não afetou o número de folículos existentes entre grupos com e sem CL, tanto em taurinos quanto em zebuínos.

Ao se analisar neste trabalho somente os grupos que continham corpo lúteo em um dos ovários (G1, G2 e G4), para se avaliar a influência local do CL, os resultados médios encontrados de ovócitos coletados foram semelhantes ($p>0,05$) entre os ovários com e sem CL (16,94 vs 18,00, respectivamente), concordando com SUGULLE et al. (2008) que também não encontraram diferenças estatísticas, nesta característica, a partir de ovários de abatedouro. Já em relação à produção de embriões, neste trabalho houve maior taxa para os ovários com CL em relação aos sem CL (40,93% vs 31,63%, respectivamente, $p<0,05$), discordando daqueles mesmos autores que não encontraram diferença estatística entre os ovários (29,0% com CL vs 30,7% sem CL) na produção de blastocistos.

TAKUMA et al. (2007) também não encontraram diferença ($p>0,05$) entre a produção de embriões provenientes de ovócitos do ovário com CL e a do ovário sem CL em taurinos, sendo os resultados obtidos, respectivamente, 57,5% e 65,7% para taxa de clivagem e 23,6% e 32,1% para produção de embriões viáveis. Eles ressaltaram que a presença local de um CL no ovário não afeta a dinâmica folicular e nem o desenvolvimento de blastocistos após a OPU.

No presente trabalho, quando se avaliou somente os grupos que possuíam CL (G1, G2, G4) e confrontou-se os resultados do ovário com e do sem CL, observou-se que o G2 e o G4 produziram mais embriões de ovócitos oriundos de ovários com CL (41,33% e 39,01%) do que sem CL (31,67% e 25,80%) e na comparação geral dos três

grupos, os ovários com CL produziram mais embriões que os sem CL (40,93% vs 31,63%).

A sincronização de onda folicular para a realização da OPU também foi avaliada. É uma prática que vem ganhando espaço a cada dia, com o intuito de padronizar o número de folículos e a qualidade dos ovócitos. De acordo com SENEDA et al. (2006) apesar da frequente utilização dos implantes de progestágenos em protocolos prévios à aspiração folicular, o seu curto período de utilização o torna questionável, enquanto SCHNEIDER et al. (2005) observaram que a atuação do implante de progestágeno melhorou algumas características em relação aos animais sem tratamento hormonal.

Neste trabalho os grupos G2 e G3 foram submetidos a implantes de progestágeno com aplicação de análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) no dia zero, sendo que G2 possuía CL e G3 não. Quando se comparou os dois grupos com os demais, eles apresentaram menos ovócitos totais aspirados (29,40 e 26,58) que G4 (44,08), que não era submetido ao implante e apresentava CL. Quando se comparou G2 com os demais que continham CL (G1 e G4) notou-se que o tratamento hormonal não melhorou nenhuma variável analisada. Quando se comparou G3 com G5, onde ambos não possuíam CL e G5 não foi submetido ao tratamento hormonal, concluiu-se que G3 (26,58) produziu menos ovócitos totais aspirados ($p < 0,05$) que G5 (40,36) e foram semelhantes nas demais características.

A aplicação de $PGF_{2\alpha}$ no G2 acarretou provavelmente uma luteólise mais funcional do que estrutural com diminuição da P_4 sérica, sendo que o objetivo principal seria diminuir a área do CL, promovendo maior espaço para as aspirações foliculares. No entanto este procedimento não foi importante para a abertura de maior espaço, visto que o tempo da aplicação até a OPU foi de apenas cinco dias, o que não resultou em maior quantidade de ovócitos recuperados no G2 em comparação com G1 e G4, que não sofreram luteólise.

Segundo BACELAR et al. (2010) a ausência de CL no momento da aspiração folicular apresenta vários aspectos favoráveis, dentre os quais a maior facilidade de localização e punção dos folículos, bem como a redução da perfusão vascular, com

menor captação de sangue, justificando a utilização do luteolítico. No entanto, segundo SENEDA et al. (2006) a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com estes objetivos é ainda questionável.

Os resultados encontrados neste trabalho concordam com CHAUBAL et al. (2007) onde os protocolos hormonais à base de progesterona sintética, em fêmeas taurinas, não melhoraram a resposta folicular e ainda produziram menos blastocistos do que vacas sem o dispositivo hormonal, pois os resultados aumentaram de $1,33 \pm 0,4$ para $2,89 \pm 0,4$ blastocistos/vaca/sessão de OPU ($p < 0,05$), quando não se utilizou os implantes.

RAMOS et al. (2010) também não encontraram vantagens na utilização do implante de P_4 associado a BE nem mesmo com a remoção do FD, em novilhas mestiças (zebuínos $\times$ taurinos), não havendo incremento na quantidade e qualidade de ovócitos e nem no número de embriões produzidos. Esta conclusão também foi feita por GOODHAND et al. (2000) que não observaram vantagens em sincronizar a onda folicular para a OPU com implante de P_4 , associado a análogo de estradiol 17β , sendo importante apenas a utilização de FSH para aumentar o número de ovócitos recuperados, já que o número de folículos aspirados saltou de $17,7 \pm 1,60$ em animais não tratados para $23,6 \pm 1,97$ em animais tratados com FSH ($p < 0,05$).

Os resultados deste trabalho discordam dos de SCHNEIDER et al. (2005) que encontraram em animais mestiços (zebuínos $\times$ taurinos) submetidos a tratamento com P_4 sintética, maior número de ovócitos totais ($28,16$ vs $13,99$, $p < 0,05$) e mais ovócitos de melhor qualidade ($9,30$ vs $2,60$, $p < 0,05$) do que o grupo controle, respectivamente. Já na produção de blastocistos, os resultados deste trabalho concordam com os dos referidos autores, que também não encontraram diferença ($p > 0,05$) entre o grupo tratado ($22,1\%$) e o controle ($15,0\%$).

BACELAR et al. (2010) submeteram 28 novilhas Nelore ao protocolo de $\text{P}_4 + \text{BE} + \text{PGF}_{2\alpha}$ no D0 e aspiração no D6 e obtiveram média de $8,07$ ovócitos totais aspirados e ainda $78,76\%$ de ovócitos viáveis (graus I, II e III). Os animais deste atual trabalho produziram quantidades de ovócitos totais maiores nos dois grupos submetidos a protocolos hormonais, sendo $29,40$ (G2) e $26,58$ (G3) com média de $27,99$, mas a

porcentagem de ovócitos viáveis foi semelhante aos resultados dos referidos autores, com 82,16% (G2) e 78,27% (G3), obtendo média de 80,21%.

Em relação a progesterona sérica, neste trabalho as vacas do G4, ou seja, aquelas que possuíam CL e não foram submetidas a protocolos hormonais, estando cíclicas, apresentaram média de 8,40ng/mL. Este valor se aproxima do encontrado por BORGES et al. (2003), em torno de 3,5 a 5,9 ng/mL, tanto em vacas Nelore quanto em Gir, entre os dias 12,1 e 14,9 do ciclo estral, como também por BORGES (2006) que foi de 11,71ng/mL em vacas com atividade luteal. Neste período de predominância de CL, JIMÉNEZ et al. (1988) encontraram maior variação, sendo de 1 a 16 ng/mL de P₄.

As maiores médias nas concentrações de progesterona, na fase de predominância de CL se devem segundo WILTBANK et al. (1995), à reorganização do tecido luteal com posterior aumento no fluxo sanguíneo ovariano e no peso do corpo lúteo.

Em vacas gestantes, a média encontrada neste trabalho foi de 18,47 ng/mL, com média de 3,4 meses de gestação. NOAKES (2001) relatou que a concentração sérica de P₄ nos primeiros 14 dias de gestação é semelhante à do diestro, em torno de 3 a 5 ng/mL e com o avanço da gestação e consolidação da placenta chega a níveis em torno de 15 ng/mL. No entanto, em algumas vacas pode haver queda a partir de 180 dias de gestação devido à menor importância do CL e predomínio da progesterona placentária.

Deve-se ressaltar neste estudo que, mesmo G1 sendo um grupo de vacas gestantes, onde há uma dificuldade aparente e um cuidado necessário para se tracionar os ovários até o fórnix, para se promover a OPU, não resultou em menores quantidades de ovócitos aspirados, sendo inclusive semelhante a todos. MEINTJES et al. (1995) constataram que vacas gestantes poderiam ser submetidas à técnica de aspiração folicular via vaginal, durante o primeiro trimestre de gestação e, SAUVÉ (1998) até o sexto mês de prenhez, sem que fosse notado qualquer prejuízo à gestação ou às vacas.

TAKUMA et al. (2010) concluíram que vacas gestantes tem maiores taxas de clivagem e desenvolvimento de blastocistos que vacas não gestantes ($p < 0,05$), mas com quantidade e qualidade de ovócitos coletados semelhantes. No entanto

DOMÍNGUEZ (1995) observou que vacas gestantes tiveram menos folículos grandes (>10mm) e médios (5 a 9mm) que as vazias e cíclicas, mas apresentaram números semelhantes de folículos pequenos (1 a 4mm). Como os folículos aspirados são os médios e grandes, os resultados deste trabalho concordam com os dados daquele autor, pois as vacas do G4 (22,04) apresentaram mais ovócitos totais aspirados que as do G1 (15,67) quando se avaliaram os grupos com presença de CL. Porém os dados discordam dos de TAKUMA et al. (2010), pois as gestantes não produziram mais embriões.

Os bons resultados na recuperação de ovócitos e produção de embriões do ovário sem CL no G1 (Tab. 5 e 6), talvez sejam atribuídos à concentração de progesterona sistêmica deste grupo de vacas gestantes, que é bem maior que nos outros, levando a entender que poderia haver uma influência deste hormônio sobre a qualidade dos ovócitos do ovário sem a P_4 local.

Nas vacas submetidas a protocolo hormonal com progestágeno os valores séricos de P_4 foram 1,53 e 2,80ng/mL, semelhantes aos encontrados por BÓ et al. (2003) que foram de 2 a 3 ng/mL e por CAVALIERI et al. (2003) que foram de 3 ng/mL, sempre no dia da OPU. Já BORGES (2006) encontrou concentração de 8,87 ng/mL em protocolos com progestágenos. Tanto BÓ et al. (2003) quanto CAVALIERI et al. (2003) relataram que a P_4 se apresenta bastante elevada nos dois primeiros dias do protocolo, mas que a partir daí diminui consideravelmente.

As vacas do G5 com 0,95ng/mL apresentaram valores semelhantes aos encontrados por BORGES et al. (2003), JIMÉNEZ et al. (1988) e NOAKES (2001), que preconizaram o animal em anestro quando houver ausência de CL e concentração sérica de P_4 abaixo de 1,0ng/mL.

A presença de CL íntegro promoveu maiores concentrações de P_4 , mas isto não influenciou totalmente as variáveis analisadas, o que não torna os grupos G1 e G4 melhores que os demais para os programas de PIV.

Segundo o comitê de nomenclatura reprodutiva em bovinos (HUBBERT, 1972) abortamento refere-se à expulsão de um feto vivo ou morto do útero entre 42 até aproximadamente 260 dias de gestação, quando este é incapaz de sobreviver em um

ambiente extra-uterino. O desaparecimento do concepto até 42 dias é denominado mortalidade embrionária, podendo ser por reabsorção ou abortamento. A expulsão do feto vivo entre 260 e 270 dias é considerada parto prematuro e a do feto morto após 270 dias de gestação é considerada natimorto. Neste trabalho foi considerado abortamento ou perda gestacional, os casos em que foram diagnosticados como prenhez aos 30 dias de gestação, mas não se encontrou feto aos 60 dias no momento da sexagem, ambos por exames ultrassonográficos.

Quanto ao número de perdas gestacionais que ocorreram entre 30 e 60 dias de gestação, a média geral foi de 2,79%, sendo 25 casos em 895 prenhez. Não houve predomínio de um grupo sobre os demais e as taxas se mantiveram dentro dos padrões normais de rebanho. Acredita-se ainda que o fato de ter havido nos grupos G2 e G4 maior quantidade de perda gestacional de embriões oriundos do ovário com CL, entende-se que não se pode atribuir à gônada da doadora de onde se originou o ovócito, o aborto ocorrido na receptora. As questões nutricionais, sanitárias e até mesmo de manejo das receptoras devem ser as maiores responsáveis por estes fatos.

A ultrassonografia aos 30 dias de gestação ainda é questionada sobre causar injúria ao útero ou ao embrião. Segundo COULTHARD (1994) o exame ultrassonográfico aos 30 dias de gestação é o maior causador de morte embrionária e MEE et al. (1994) responsabilizam o exame ultrassonográfico por uma taxa de 10% de abortamento.

No entanto BARROS & VISINTIN (2001) defendem que os exames ultrassonográficos não causam perdas gestacionais em animais *Bos indicus* ou *Bos indicus* x *Bos taurus*. Também BALL & LOGUE (1994), GALLAND et al. (1994) e HUGHES & DAVIES (1989) isentam o exame ultrassonográfico de qualquer culpa sobre a morte embrionária.

Em relação ao ovário em que predominou o corpo lúteo, os grupos G1, G2 e G4 mantiveram uma superioridade do CL no ovário direito, apresentando uma proporção média de 70% a 30% em relação ao esquerdo. Especificamente no G1, as gestações foram 54% no corno direito e 46% no esquerdo, sendo todas ipsilaterais ao CL.

Segundo McENTEE (1990) o tamanho dos ovários varia de acordo com o estágio do ciclo estral, estágio de prenhez, idade e condições gerais do animal. O ovário direito geralmente é maior que o esquerdo, por ter maior atividade fisiológica, e ovula em aproximadamente 60% dos ciclos estrais.

Além de concordar com as afirmações de McENTEE (1990), os dados deste trabalho também corroboram com os de RAMOS et al. (2008) que obtiveram 61,64% das taxas de gestações no corno direito e no total dos animais por eles avaliados o CL estava no ovário direito em 56,23% e no lado esquerdo em 43,77%. MEGALE & COUTO (1959 apud NEVES et al., 2002) também encontraram gestações predominantemente no corno direito. LEAL et al. (2009) localizaram o CL em 63,3% dos animais no ovário direito e 36,7% no ovário esquerdo. JAINUDEEN & HAFEZ (2004) confirmam que a ovulação em vacas ocorre mais frequentemente no ovário direito (60,0%) que no ovário esquerdo (40,0%).

Esta superioridade de ovulações com formação de CL no ovário direito foi também relatada por outros autores sendo, respectivamente, 64,0% vs 36,0% (DEMCZUK et al., 1998), 57,0% vs 43,0% (HASLER et al., 1987), 60,0% vs 40,0% (SPELL et al., 2001) e 57,14% vs 42,86% (VIANA et al., 1999).

No entanto os dados deste trabalho discordam de alguns autores como CHACUR et al. (2009) que encontraram 65,47% dos corpos lúteos no ovário esquerdo e 34,53% no direito e também de NEVES et al. (2002) que relataram 51,2% dos CL no ovário esquerdo e 48,8% no direito e ainda 53,0% das gestações no corno esquerdo e 47% no direito, não sendo todas ipsilaterais ao ovário com CL.

Ao se avaliar a proporção do sexo dos fetos notou-se que não houve predomínio de um grupo sobre os demais em relação a um dos sexos. Também não houve superioridade de um sexo dentro de cada grupo individualmente. Quando se avaliou os ovários com e sem CL, também não existiu predomínio de um sexo em relação ao fato de ser de ovócito oriundo de ovário com ou sem CL. Estes fatos reforçam o entendimento de que a definição do sexo independe do estado fisiológico da fêmea ou do ovário em que se originou o ovócito.

Estes dados discordam de várias pesquisas de produções *in vitro* com sêmen convencional, pois segundo AVERY et al. (1991) a escolha para a inovulação, de blastocistos produzidos *in vitro*, de desenvolvimento mais avançado, favorece os embriões de sexo masculino, por desenvolverem mais rápido, em detrimento aos do sexo feminino. Este fato foi confirmado por GUTIERREZ-ADÁN et al. (2001) que encontraram uma proporção de 70% de machos sendo explicada pelas condições de cultivo dos embriões, principalmente com a utilização do soro fetal bovino, com alta concentração de glicose que poderia acelerar o desenvolvimento dos machos e retardar o de fêmeas.

No entanto RHEINGANTZ et al. (2004) observaram que a presença de glicose no meio de cultivo não afetou a proporção entre machos e fêmeas, no total dos embriões produzidos a partir do método do *swim-up* ou do Percoll. Porém eles observaram que na ausência de glicose obteve-se um maior percentual de embriões machos quando foi utilizado o método do *swim-up* do que com o método do Percoll. PEGORARO et al. (2002) também constataram que o método *swim-up* resultou em maior proporção de machos entre embriões bovinos produzidos *in vitro*, enquanto o gradiente de Percoll não determinou desvios na proporção macho:fêmea. Neste trabalho foi utilizado o gradiente de Percoll para o preparo do sêmen, o que provavelmente resultou em proporções similares entre os sexos, mas foi utilizado o piruvato de sódio em vez de glicose, nas etapas de MIV, FIV e CIV.

CAMARGO et al. (2010) verificaram que a PIV não aumentou o tempo de gestação, mas aumentou a taxa de machos (76,9%) e o peso do bezerro ao nascer. Porém, MACHADO et al. (2009) não encontraram diferença na proporção de machos e fêmeas, mantendo a proporção esperada de 1:1, mesmo utilizando diferentes touros e diferentes tratamentos, na preparação do sêmen para a FIV.

De acordo com MERTON et al. (2009) os parâmetros genéticos podem predizer quais os melhores animais para a produção *in vitro* de embriões. Eles encontraram estimativas de herdabilidade para bovinos sobre características importantes tais como 0,25 para o número de complexos *cumulus-ovócitos*, 0,09 para a qualidade de complexos *cumulus-ovócitos* e 0,10 para embriões transferíveis no dia sete.

Segundo BONI et al. (1997) o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular é uma característica de alta repetibilidade ($r = 0,576$) e por isso apresenta diferenças entre indivíduos.

7. CONCLUSÕES

Em fêmeas bovinas doadoras de ovócitos da raça Nelore foi observado que:

A aspiração de ovócitos de vacas com a presença de CL mostrou que os ovários com CL produziram mais embriões viáveis aos sete dias pós-fecundação *in vitro*, do que os sem CL.

A produção de embriões provenientes de ovócitos de ovários sem CL em vacas gestantes foi maior, talvez pela maior concentração de P_4 circulante.

A utilização de protocolos hormonais à base de progestágeno por cinco dias para a aspiração folicular das doadoras, não apresentou benefícios em relação à sua não utilização.

A aplicação de $PGF_{2\alpha}$ em vacas com CL, submetidas a implante de progestágeno, não melhorou a quantidade de ovócitos totais coletados, durante a punção folicular superficial dos ovários.

A taxa de prenhez das receptoras não foi influenciada pela situação fisiológica da doadora dos ovócitos, em programas de PIV.

A proporção entre os sexos dos fetos não dependeu da situação fisiológica da doadora, quando o sêmen utilizado na FIV foi convencional.

Portanto, o melhor critério de escolha de doadoras Nelore ou de manejo para programas de PIV é o conhecimento individual de cada animal ao longo das seções de OPU.

8. REFERÊNCIAS

ABDOON, A.S.; KANDIL, O.M. Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 41, n. 1, p. 71-77, Jan-Feb 2001.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 19-24, Jan. 1994.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, Apr. 1996.

AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 953-963, May 1991.

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, Jan./Mar. 2010.

BALL, P.J.H.; LOGUE, D.D.N. Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 20, p. 532, May 1994.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J.A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 38, n. 2, p. 74-79, 2001.

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

BAVISTER, B.D.; HELLEKANT, T.A.R.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. [Theriogenology](#), v. 37, n. 1, p. 127-146, Jan. 1992.

BERLINGUER, F.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; LEONI, G.; MOSSA, F.; BEBBERE, D.; ARIZNAVARRETA, C; TRESGUERRES, J.A.; VEIGA-LOPEZ, A.; NAITANA, S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 32, n. 4, p. 303-314, May 2007.

BIASE, N.G.; FERREIRA, D.F. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de K populações independentes. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 27, n. 3, p. 301-323, Jul/Set. 2009.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, Jan. 2002.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54-62, May 1995.

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

BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.H.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 277-289, Jul. 1997.

BORGES, A. M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 276-283, Mar/Apr. 2003.

BORGES, M.C.B. **Efeito do estradiol associado ao progestágeno sobre a taxa de sincronização do estro, de ovulação e prenhez em vacas zebuínas lactantes no pós-parto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 48 p. Dissertação de Mestrado.

CAMARGO, L.S.; FREITAS, C.; de SÁ, W. F.; de MORAES FERREIRA, A.; SERAPIÃO R.V.; VIANA, J.H. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 10-15, Jul. 2010.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F. 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, n. 3-4, p. 189-196, Apr. 2007.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; PARKER, K.I.; WRIGHT, P.J.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 3, p. 177-193, Apr. 2003.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; OBA, E.; KRONKA, S.N. Correlações da morfometria ovariana e hormonais de progesterona e cortisol em vacas zebus não prenhes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 870-878, Jul./Set. 2009.

CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 719-728, Mar. 2007.

CHIAN, R.C.; CHUNG, J.T.; DOWNEY, B.R.; TAN, S.L. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 4, n. 2, p. 127-132, Mar. 2002.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G.; CAIGUA, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZALEZ-BULNES, A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 47-55, Feb. 2008.

COULTHARD, H. Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 16, p. 427-428, Apr. 1994.

DAS G.K.; JAIN G.C.; SOLANKI V.S.;TRIPATHI, V.N. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. **Theriogenology**, v. 46, n. 8, p. 1403-1411, Dec. 1996.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, v. 28, n. 1, p.181-185, 2000.

DE LOOS, F.; KASTRUP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, n. 3, p. 255-259, Mar. 1991.

DEMCZUK, E.; KOZICKI, L.E.; PONTELLI, E.S.; SALLES, J.O. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 174-177, 1998.

DOMÍNGUEZ, M.M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1405-1418, Jul. 1995.

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUGUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1549-1561, Jun. 1997.

DRIANCOURT, M.A.; FEVRE, J.; MARTAL, J.; AL GUBORY, K.H. Control of ovarian follicular growth and maturation during pregnancy in sheep by the corpus luteum and placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 1, p. 151-158, Sep. 2000.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. UFSCar, São Carlos, **Anais...** São Carlos: UFSCar 2000, p. 255-258.

GALLAND, J.C.; OFFENBACH, L.A.; SPIRE, M.F. Measuring the time needed to confirm fetal age in beef heifers using ultrasonographic examination. **Veterinary Medicine**, v. 89, n. 8, p. 795-804, Aug. 1994.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1341-1357, Apr. 2001.

GARDNER, D.K.; LANE, M.; SPITZER, A.; BATT, P.A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 390-400, Feb. 1994.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, Oct. 2003.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, Dec. 1996.

GONZALEZ-BULNES, A.; BERLINGUER, F.; COCERO, M.J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; LEONI, G.; NAITANA, S.; ROSATI, I.; SUCCU, S.; VEIGA-LOPEZ, A. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances *in vivo* and *in vitro* blastocysts output in sheep. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1392-1403, Oct. 2005.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO, M.J.; LOPEZ, S.A.; COCERO, M.J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology**, v. 58, n.8, p. 1607-1614, Nov. 2002.

GOODHAND, K.L.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.; BROADBENT, P.J. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 3-4, p. 145–158, Nov. 2000.

GREVE, T.; HYTTEL, P.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 41-50, Jan. 1995.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, n. 5, p. 1117-1126, Mar. 2001.

HAGEMANN, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 449-459, Jan. 1999.

HASLER, J.F.; MCCAULEY, A.D.; LATHROP, W.F.; FOOTE, R.H. Effect of donor-embryo-recipient interactions and pregnancy rate in a large-scale-bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 139-168, Jan. 1987.

HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBING, R.B.; WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 509-522, Jan. 1995.

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, n. 1, p. 11-20, Jan. 2000.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, Sep. 1999.

HUBBERT, W.T. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms by committee on bovine reproductive nomenclature. **The Cornell Veterinarian**, v. 62, n. 2, p. 216-237, Apr. 1972.

HUGHES, E.A.; DAVIES, D.A.R. Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 17, p. 456-458, Apr. 1989.

IETS - SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Illinois: IETS, 1998. 180p.

JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. cap. 11, p. 159-171.

JIMÉNEZ, F.; GALINA, C.S.; DUCHATEAU, A.; NAVARRO-FIERRO, R. Levels of LH, progesterone and estradiol-17 β during natural and PGF_{2 α} induced estrus in Indubrazil

and Brown Swiss cows in the tropics. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 3, p.199-206, 1988.

KNOPF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLEMBERGER, E.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 111-119, Apr. 1989.

LEAL, L.S.; OBA, E.; FERNANDES, C.A.C.; SÁ FILHO, O.G. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 1, p. 174-183, Jan/Mar. 2009.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 2, p. 376-383, Mar. 1987.

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**, v. 37, n. 1, p. 48-53, Jan. 1994.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; CECILIANI, F.; PELUSO, J.J. Progesterone receptor membrane component-1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization and early embryonic development. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 663-672, Nov. 2010.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-1297, May 2009.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F.; KREPELOVÁ, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 543-550, Sep. 2000.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 801-810, Mar. 1996.

MACHATKOVÁ, M.; KRAUSOVÁ, K.; JOKESOVÁ, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 3, p. 329-335, Jan. 2004.

MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.; RAVINDRA, J.P.; DEVARAJ, M.; RAMESH, H.S.; NANDI, S. *In vitro* developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 68, n. 6, p. 882-888, Oct 2007.

McENTEE, K. **Reproductive pathology of domestic mammals**. San Diego: Academic Press, 1990, 401 p.

MEE, J. F.; RYAN, D. P.; CONDON, T. Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 20, p. 532, May 1994.

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. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 967-974, Apr. 1995.

MERTON, J.S.; ASK, B.; ONKUNDI, D.C.; MULLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-*in vitro* production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885-893, Oct. 2009.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONSALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.

Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Livraria Varela, 2001. cap.3, p.25-55.

NEVES, M.M.; MARQUES JR, A.P.; SANTANA C.V.; LIMA F.P.C. ; ZAMBRANO, W.J. Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 651-654, Dec. 2002.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; McINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n.1, p. 1-29, Jan. 2000.

NOAKES, D.E. Pregnancy and its diagnosis. In: NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8. ed. London: WB Saunders, 2001. p. 69-118.

OLIVERA, A.M.; TARAZONA, M.A.; RUÍZ, C.T.; GIRALDO, E.C. Vías implicadas en la luteólisis bovina. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 20, n. 3, p. 387-393, Sep. 2007.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, Apr. 1986.

PEGORARO, L.M.C.; RHEINGANTZ, M.G.T.; DESCHAMPS, J.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; SAALFELD, M.H. Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 751, 2002.

PETYIM, S.; BAGE, R.; FORSBERG, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. **Journal of**

Veterinary Medicine Series A: Phisiology, Pathology, Clinical Medicine, v. 47, n.10, p. 627-640, Dec. 2000.

PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A.S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 175-188, Jun. 2003.

PIMENTEL-GOMES, F. **O índice de variação, um substituto vantajoso do coeficiente de variação**. Piracicaba: IPEF, 1991. 4p. (Circular técnica, 178).

RAMOS, A.F.; RUMPF, R.; CÂMARA, J.U.; MOLLO, M.R.; PIVATO, I.; MARQUES, A.P.Jr.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on *in vitro* embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 201-207, Feb. 2010.

RAMOS, E.M.; CAVALCANTE, T.V.; NUNES, R.R.M.; OLIVEIRA, C.M.; SILVA, S.M.M.S.; DIAS, F.E.F.; MARUO, V.M.; ARRIVABENE, M. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 696-702, Out/Dez. 2008.

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 ovócitos e de embriões produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006.

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

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozóides selecionados por *Swim-up* ou Gradiente de Percoll. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 1, Jan./Feb. 2004.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J.F.; O'FARREL, K.J.; MACSIURTAI, M.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939-949, Feb. 2005.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. In: **Anais da XIII Reunião Anual da SBTE**, v. 26, n. 1, p. 141-145, 1998.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 241–251, Aug. 2004.

SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L.F.M.; RUMPF, R.; PIVATO, I.; DIONELO, J.L.; CORRÊA, M.N. **Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e produção *in vitro* de embriões**. 2005. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CA_01024.rtf> Acesso em 9 out. 2010.

SENEDA, M.M.; SANTOS, G.M.G.; SILVA, K.C.F.; SPEGIORIN, M.R.; BLASCHI, W.; PONTES, J.H.F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, n.2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Ed. da UEL, 2006. p. 172-180.

SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 699-708, Mar. 1999.

SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 287-297, Jul. 2001.

STANCZYK, F.Z. All progestins are not created equal. **Steroids**, v. 68, n. 10-13, p. 879-890, Nov. 2003.

SUGULLE, A.H.; DOCHI, O.; KOYAMA, H. Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue Staining: Effect of the presence of corpus luteum on embryo development. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 25, n. 1, p. 50-55, May 2008.

TAKAGI, M.; CHOI, Y.H.; KAMISHITA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; MIYAMOTO, A.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 3, p. 195-203, May 1998.

TAKUMA, T.; OTSUBO, T.; KUROKAWA, Y.; OTOI, T. Effects of the corpus luteum within the ovary on the follicular dynamics after follicular aspiration and on the developmental competence of aspired oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 324, Jan. 2007.

TAKUMA, T.; SAKAI, S.; EZOE, D.; ICHIMARU, H.; JINNOUCHI, T.; KAEDEI, Y.; NAGAI, T.; OTOI, T. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. **The journal of reproduction and development**, v. 56, n. 1, p. 55-59, Feb. 2010.

THIBIER, M. Biosecurity and the various types of embryos transferred. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 260-267, Aug. 2006.

VARISANGA, M.D.; SUMANTRI, C.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1015-1023, Nov. 1998.

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**, v. 76, n. 1-2, p. 25-41, Mar. 2003a.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 923-932, Sep. 2003b.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, Jun. 1999.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, Dec. 2000.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplement**, n. 61, p. 71-90, 2003.

WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; MIYAMOTO, A.; CERBITO, W.A.; ACOSTA, T.J.; TAKAGI, M.; SATO, K. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. **Theriogenology**, v. 49, n.3, p. 607-618, Feb. 1998.

WILTBANK, M.C.; SHIAO, T.F.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 74-78, Jan. 1995.

WIT, A.A.C.; 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**, v. 78, n. 5, p. 1277-1283, May 2000.

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW, T.R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042-1055, Sep. 2004.

ZEUNER, A.; MÜLLER, K.; REGUSZYNSKI, K.; JEWGENOW, K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1421-1433, Mar. 2003.