JÚLIO CÉSAR BARBOZA DA SILVA

Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões

São Paulo

2014

JÚLIO CÉSAR BARBOZA DA SILVA

Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Ed Hofmann Madureira

Co-orientador:
Dra. Roberta Ferreira Machado Saran

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3042
FMVZ

Silva, Júlio César Barboza

Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões / Júlio César Barboza da Silva. -- 2014.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Ed Hofmann Madureira.

Co-orientador: Dra. Roberta Machado Ferreira Saran.

1. Oócito. 2. Folículo. 3. Vaca holandesa. 4. Prostaglandina. 5. OPU. I. Título.

São Paulo, 04 de setembro de 2014
CEUA N 361402

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Ed Hoffmann Madureira
Executante: Júlio César Barboza da Silva
Depto/Disc: Reprodução Animal
Pesquisadores associados: Roberta Machado Ferreira Saran (usp); Milton Maturana Filho (usp); Julianne De Rezende Naves (usp); Ed Hoffmann Madureira (orientador)

Título do projeto: "Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à Ovum Pick Up, visando melhorar a produção in vitro de embriões".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

No presente projeto o pesquisador elaborará estratégias eficientes, visando melhorar a qualidade e a quantidade dos oócitos recuperados e consequentemente aumentar a produção in vitro de embriões em doadoras de raças leiteiras, utilizando 36 bovinos.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 04/12/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Júlio César Barboza

Título: Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

Ao meu avô materno, PEDRO ALTAMIRO PRADO, que acompanhou meus primeiros passos como aluno, desde os 4 anos de idade no Educandário São José, em Ouro Fino/MG. Logo depois foi o Colégio Agrícola, em Espírito Santo do Pinhal/SP, quando ele me dava a benção e um “dinheirinho” para o sorvete e eu saía com minha mochila nas costas, feliz da vida! A seguir foi o cursinho em Campinas/SP e o mesmo companheirismo e atenção. Ele se emocionou muito com a conquista do neto quando passei no vestibular e ingressei Universidade Rural, na Seropédica/RJ, mas no ano seguinte ele se foi para outro plano.

Quanta saudade, meu avô! Olhe por mim...

Aos meus pais JOAQUIM BARBOZA DA SILVA e WILMA VICTÓRIA PRADO DA SILVA, que me educaram com imenso amor, contribuindo para a formação do meu caráter, legado que carrego por toda a vida!

Meu pai e minha mãe, que Deus os abençoe, sempre!

À minha esposa ANDREA DA SILVA SANDRINI, com muito amor e carinho, por acreditar que eu seria capaz de vencer este desafio e por ter me apoiado nessa iniciativa. Mãe de extremo zelo, determinante na criação de nossas duas joias, nossos filhos, MATEUS e TIAGO, que desde a tenra idade já gostam de estudar. Que sejam felizes na escolha de suas profissões e se orgulhem delas, como faz o papai!

AGRADEÇO

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, Senhor supremo do universo, que governa todas as coisas, visíveis e invisíveis.

Ao meu orientador Prof. Dr. ED HOFMANN MADUREIRA, pelos ensinamentos e amizade, à minha co-orientadora Dra. ROBERTA MACHADO FERREIRA SARAN, pela inestimável colaboração e disponibilidade. Agradeço também os colegas MILTON MATURANA, BRUNA OLIVEIRA, THIAGO SANTIN, KLÉBER MENEGON, LAIS VIEIRA, SHIRLEY FLORES, ANGELA GONELA, MILENA OLIVEIRA, JULIANA DELGADO, JÚLIA SOARES e SARA SCOLARI pela ajuda durante o desenvolvimento do mestrado.

Sou grato também a todos os professores do VRA pelos conhecimentos adquiridos que passaram a fazer diferença no desempenho de minha profissão.

Ao RAFAEL MOREIRA e FELIPE VIANNA, representando a empresa União Química. Ao Sr. ARMANDO MENGE e PEDRO MOREIRA, que juntos constroem a história de sucesso da empresa Menge Gado Holandês, meus mais sinceros agradecimentos pela colaboração e confiança.

Aos amigos ANTÔNIO AUGUSTO e sua esposa DÉBORA por me acolheram em sua casa, em Pirassununga, com a autêntica hospitalidade mineira.

Ao colega BRUNO BONAMICHI pelo apoio no atendimento aos meus clientes quando fui impossibilitado de fazê-lo por estar cursando alguma disciplina.

À secretária da PPGRA HARUMI SHIRAISHI pela presteza, paciência e orientação.

Um agradecimento especial ao colega e amigo CARLOS FERNANDO MARINS RODRIGUES, por ter contribuído, e muito, para a minha formação profissional.

Obrigado a todos!

“As dificuldades devem ser usadas para crescer, não para desencorajar. O espírito humano cresce mais forte no conflito”

William Ellery Channing

RESUMO

SILVA, J. C. B. Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões. [Use of FSH during synchronization of emergence of follicular wave in donors submitted to *Ovum Pick Up*, as an attempt to improve the *in vitro* production of embryos]. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Bioteχνologias como a *Ovum Pick-Up* e a Produção *In vitro* de embriões (OPU-PIVE) tem sido uma importante ferramenta para alcançar o melhoramento genético rápido nos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações. No Brasil, a PIVE está em fase de crescimento e representa 70,7% de toda a produção *in vitro* mundial. Contudo a OPU-PIVE é ainda ineficiente em vacas de leite, especialmente devido à sua reduzida população folicular. Muitos estudos têm mostrado um efeito positivo do FSH em gado de leite e corte. Recentemente, a pré-estimulação com FSH mostrou ser capaz de aumentar o diâmetro dos folículos aspirados e a porcentagem de embriões transferíveis. O FSH estimula o recrutamento dos folículos na fase antral, fazendo com que eles possam se desenvolver até o momento em que ocorre a divergência e um ou mais folículos se torne dominante. A hipótese do presente estudo é que o uso de FSH (200 mg), fracionado em 4 ou 6 aplicações, em vacas holandesas não lactantes, com emergência de onda folicular sincronizada, aumenta o número de folículos ovarianos, o número de oócitos viáveis e a quantidade de embriões na produção *in vitro*. Trinta e seis vacas Holandesas não lactantes foram utilizadas como doadoras de oócitos e distribuídas em três tratamentos: Controle (C), 4 aplicações de FSH (F4) e 6 aplicações de FSH (F6). Todas as vacas foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de emergência de onda folicular, diferindo apenas pela administração e número de 4 ou 6 doses de FSH, conforme descrito acima. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), todas as vacas receberam um dispositivo de P4 (Primer[®], Tecnopec-Agener União, São Paulo, SP, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (Ric-BE[®], Tecnopec-Agener União, São Paulo, SP, Brasil). Três dias após (D3), foi administrado 0,530 mg de Cloprostenol Sódico (Cioprostinn[®], Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda, Monte Aprazível, SP, Brasil), induzindo a luteólise com

a intenção de liberar espaço no estroma ovariano para o crescimento folicular e facilitar a visualização de folículos na OPU. Vacas do grupo C não receberam tratamentos adicionais. Vacas do grupo F4 receberam 200 mg de FSH (Folltropin - Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) fracionados em 4 aplicações de equivalentes concentrações em intervalos de 12 h, iniciando no D4 pela manhã. Vacas do grupo F6 receberam 200 mg de FSH fracionados em 6 aplicações de equivalentes concentrações em intervalos aproximados de 12 h, tendo início no D3 pela manhã. No D7, o dispositivo foi removido e a OPU realizada concomitantemente à contagem dos folículos existentes nos ovários. Os oócitos considerados viáveis foram fertilizados *in vitro* com sêmen sexado de touros da raça Holandesa. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMIX do SAS 9.3, utilizando contrastes ortogonais C1 (C x FSH) e C2 (F4 x F6). Não houve efeito de tratamento no número de folículos (C = $53,3 \pm 4,9$ vs FSH = $51,36 \pm 3,1$; P = 0,89), número total de oócitos (C = $19,46 \pm 1,64$ vs FSH = $18,47 \pm 1,27$; P = 0,55), número de oócitos viáveis (C = $12,57 \pm 1,26$ vs FSH = $12,70 \pm 1,03$; P = 0,606), taxa de recuperação de oócitos (C = 36,5% vs FSH = 36,0%; P = 0,48) e produção de embriões *in vitro* (C = $4,11 \pm 0,52$ vs FSH = $4,32 \pm 0,46$; P = 0,79). Apesar de não ter havido efeito no número de folículos, o tratamento com FSH alterou a distribuição dos mesmos, proporcionando o aumento no número de folículos médios (6 a 10 mm). No entanto, não houve efeito do tratamento com FSH no número de oócitos totais e viáveis recuperados, nem na produção de embriões.

Palavras-chave: Oócito. Folículo. Vaca holandesa. Prostaglandina. OPU.

ABSTRACT

SILVA, J. C. B. Use of FSH during synchronization of emergence of follicular wave in donors submitted to Ovum Pick Up, as an attempt to improve the in vitro production of embryos. [Utilização de FSH durante a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular de doadoras submetidas à *Ovum Pick Up*, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões]. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Reproductive biotechnologies such as Ovum Pick-Up and *in vitro* Embryo production (OPU-IVEP) have been widely used as important tools to achieve faster genetic improvement in herds, diminishing the intervals between generations. In Brazil, *in vitro* Embryo Production (IVEP) is growing in popularity and accounts for 70.7% of all *in vitro* embryo production worldwide. However, the OPU-IVEP is still poorly efficient in high-producing dairy cattle, especially because of their reduced follicular population. Several studies have shown a positive effect of FSH on OPU-IVEP yield. Recently, FSH pre-stimulation has shown to be able to increase the diameter of aspirated follicles and the percentage of transferable embryos. The hormone FSH stimulates follicle recruitment in the antral phase, in the way that they develop until the moment of divergence and one or more follicles becomes dominant. The hypothesis of this study is that the use of 200mg FSH split into 6 doses in non-lactating Holstein cows with a synchronized follicular wave emergence increases the number of follicles, the recovery rate and the number of embryos produced *in vitro*. Thirty six Holstein cows used as oocyte donors were homogenously allocated to one of three treatment groups in a 3x3 Latin square design: Control (C); 4 doses of FHS (FSH4); 6 doses of FSH (F6). All cows were synchronized using the same protocol for synchronization of follicular wave emergence, except for the administration and number of doses of FSH as previously described. At random days of the estrous cycle known as D0, all cows received an intravaginal P4 device (Primer[®], Tecnopec-Agener União, São Paulo, Brazil) and 2mg estradiol benzoate (Ric-BE[®], Tecnopec-Agener União). Three days after (D3), all cows received 0.530 mg D-Cloprostenol (Cioprostinn[®], Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda, Monte Aprazível, SP, Brasil). Cows from the Control group received no additional treatment. Cows from group FSH4 were treated with 200 mg of FSH split in 4 doses of

similar concentration given approximately 12 h apart, starting on D4 AM. Cows from group FSH6 were treated with 200 mg of FSH split in 6 doses of similar concentration given approximately 12 h apart, starting on D3 AM. On D7, the device was removed and OPU was performed concomitant with antral follicle count in each ovary. The oocytes considered as viable were sent to IVEP. Data was analyzed using the Glimmix of SAS 9.3, with orthogonal contrasts C1 (C x Treatment with FSH) and C2 (FSH4 x F6). There was no effect on the number of antral follicle ($C = 53.3 \pm 4.9$ vs $FSH = 51.36 \pm 3.1$; $P = 0.89$), number of total oocytes ($C = 19.46 \pm 1.64$ vs $FSH = 18.47 \pm 1.27$; $P = 0.55$), number of viable oocytes ($C = 12.57 \pm 1.26$ vs $FSH = 12.70 \pm 1.03$; $P = 0.61$), oocyte recovery rate ($C = 36.5\%$ vs $FSH = 36.0\%$; $P = 0.48$) and number of embryos produced *in vitro* ($C = 4.11 \pm 0.52$ vs $FSH = 4.32 \pm 0.46$; $P = 0.79$). Although FSH treatment did not affect the number of follicles, it affected the distribution of them, increasing the number of follicles from 6 to 10 mm. However, FSH treatment did not alter the total number of oocytes and number of viable oocytes or embryo production.

Keywords: Oocyte. Follicle. Holstein. Prostaglandin. OPU

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	HIPÓTESE	15
3	OBJETIVOS	16
4	REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1	ESTADO DA ARTE DA OPU-PIVE NO BRASIL E NO MUNDO	17
4.2	SELEÇÃO DE DOADORAS DE OÓCITOS	19
4.2.1	Categoria Animal	19
4.2.2	População folicular	19
4.3	FISIOLOGIA OVARIANA	20
4.3.1	Fatores ligados ao folículo	21
4.3.2	Fatores associados aos oócitos	23
4.4	HORMÔNIOS FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) E LUTEINIZANTE (LH).....	24
4.5	PROTOCOLOS PARA OPU	26
4.5.1	Sincronização da onda de crescimento folicular	26
4.5.2	Superovulação	26
4.5.3	“Coasting period”	28
4.5.4	Remoção do corpo lúteo	30
5	JUSTIFICATIVA	31
6	MATERIAL E MÉTODOS	32
6.1	EXPERIMENTO.....	32
6.1.1	Local de Execução	32
6.1.2	Animais	32
6.1.3	Delineamento Experimental e tratamentos	32
6.1.4	Ovum-pick-up (OPU)	35
6.1.5	Produção In Vitro de Embriões (PIVE)	36
6.1.6	Doppler	37
6.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
7	RESULTADO	40
7.1	POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS ANTRAIS (PFA)	40
7.2	VARIÁVEIS FOLICULARES	41
7.3	VARIÁVEIS OOCITÁRIAS	43
7.4	PIVE.....	44
7.5	VASCULARIZAÇÃO OVARIANA	45

8	DISCUSSÃO	48
9	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A aspiração folicular por via transvaginal, guiada por ultrassom (OPU), acoplada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) se consolidou como uma alternativa prática e viável, sendo utilizada em larga escala em programas comerciais (MERTON et al., 2003).

Essas biotecnologias tem sido intensamente utilizadas como forma de incrementar tanto do desempenho reprodutivo quanto da qualidade genética do rebanho leiteiro, mundialmente, contribuindo para o desenvolvimento da indústria animal e fornecendo subsídios para a pesquisa (BLONDIN et al., 2012). Nesse contexto, os avanços nos conhecimentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação possibilitaram a manipulação do ciclo estral em bovinos e o estabelecimento de alternativas para otimizar a produção de embriões.

No Brasil, a PIVE se destaca por estar em uma fase de grande crescimento, tendo atingido a marca de 318.116 embriões produzidos em 2011, o que equivale a 70,69% da produção mundial de embriões *in vitro*, representando 20% de crescimento em relação à 2010 (MAPLETOFT, 2013). No entanto, a PIVE é ainda bastante ineficiente em vacas leiteiras de alta produção e influenciada por diversos fatores de ordem técnica e biológica, sendo os de ordem técnica os mais estudados levando atualmente a diversas opções de sistemas de aspiração folicular e cultivo (BOLS et al., 2004).

Sabe-se, que o sucesso dessas biotécnicas ainda está diretamente relacionado ao número e qualidade dos complexos *cumulus*-oócito (COCs) destinados ao cultivo e que são diretamente influenciados por fatores biológicos (VIANA; BOLS; 2005). Dessa forma é importante considerar a influência de tais fatores como a lactação, a fase do ciclo estral, a população de folículos antrais, e a utilização de hormônio folículo estimulante (FSH), na tentativa de melhorar os resultados. Vacas de alta produção leiteira possuem alterações significativas na fisiologia reprodutiva, dentre as quais se destaca a elevação do metabolismo hepático do estradiol (WILTBANK et al. 2006). Adicionalmente, sabe-se que oócitos e embriões são altamente sensíveis a qualquer perturbação do meio onde estão, sejam estas causadas por alterações no metabolismo, na dieta ou por outros fatores podendo ter consequências fatais na fertilidade (McEVOY et al., 2001).

Nesse contexto, foi observado que oócitos de vacas de alto mérito genético para a produção leiteira resultaram em reduzida produção *in vitro* de blastocistos, comparados a

oócitos de vacas de baixo mérito genético (SNIJDERS et al., 2000). Essa evidência reforça a existência de efeitos deletérios da lactação sobre a qualidade oocitária e, conseqüentemente, sobre a fertilidade (SNIJDERS et al., 2001). Portanto, o uso de vacas não lactantes como doadoras de gametas pode ser uma interessante estratégia para melhorar os resultados da PIVE.

2 HIPÓTESE

A hipótese científica do presente estudo foi que a utilização de FSH (200 mg), em vacas não lactantes, com emergência de onda folicular sincronizada, divididos em seis e quatro aplicações, comparado ao controle, aumenta o número de folículos médios (6 a 10 mm), presentes nos ovários, no dia da OPU, o número de oócitos recuperados por OPU e o número de embriões viáveis, produzidos *in vitro*.

Figura 1 - Modelo Hipotético Gráfico demonstrando a eficácia de FSH em doadoras bovinas de oócitos

Modelo Hipotético Gráfico Inicial

Fonte: (SILVA et al., 2014)

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da utilização de FSH (200 mg) dividido em seis aplicações consecutivas, em vacas não lactantes, com emergência da onda folicular sincronizada sobre:

- o número de folículos ovarianos médios (6 a 10 mm), no dia da OPU;
- o número de oócitos totais e viáveis, recuperados por OPU;
- a taxa de produção de blastocistos *in vitro*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ESTADO DA ARTE DA OPU-PIVE NO BRASIL E NO MUNDO

O emprego das biotecnologias para produção de embriões tem como objetivo, em primeiro lugar, o aumento do número de animais de alto valor genético. Neste contexto, o número de embriões por sessão é um importante fator que refletirá o sucesso do procedimento (MERTON et al. 2003).

Desde a década de 80, a superovulação (SOV) seguida da inseminação artificial (IA) e da transferência dos embriões (TE) para receptoras possibilitou disseminar genética de alta qualidade, melhorando o desempenho reprodutivo, principalmente do gado leiteiro e das vacas repetidoras de cio (AMBROSE et al., 1999; HANSEN et al., 2001; BARUSELLI et al., 2011). Entretanto, existem algumas limitações na utilização dessa técnica, como a necessidade de iniciar a SOV em momento determinado do ciclo estral, pouca consistência na produção de embriões viáveis pelas doadoras e indução de patologias reprodutivas depois de repetidos tratamentos superovulatórios. Com o advento da OPU e da PIVE, no início da década de 1990, houve um crescimento da expectativa no incremento da produtividade das fêmeas (GALLI et al., 2003). Por exemplo, realizando-se 2 sessões de aspiração por semana em uma vaca, a produção pode alcançar 150 embriões por ano, resultando em 70 prenhez, possibilitando o uso de vários touros, aumentando assim o número de acasalamentos possíveis (MERTON et al., 2003).

Considerando-se que o nascimento de fêmeas é desejado em rebanhos leiteiros e que o sêmen sexado possui um reduzido número de espermatozoides viáveis por palheta, deve-se levar em consideração a fertilização *in vitro* (FIV) como a melhor forma de aproveitamento da técnica (GARNER; SEIDEL, 2008).

No sentido de aumentar o número de oócitos viáveis por aspiração, estratégias como a estimulação do desenvolvimento folicular tem sido utilizadas, aplicando-se hormônios gonadotróficos em diferentes esquemas e dosagens, com resultados variáveis (KAJIHARA et al. 1991; TANEJA et al. 2000). Diversos grupos relataram a ocorrência de efeito positivo da estimulação com FSH, previamente à OPU, sobre a qualidade dos oócitos recuperados e a competência de desenvolvimento dos COCs (BLONDIN et al., 1997; BOUSQUET et al., 1999; GOODHAND et al., 1999; MERTON et al., 2003; SENDAG et al., 2008; BLONDIN et al., 2012).

A aquisição de conhecimento sobre o crescimento folicular, início e final do processo de maturação oocitária ajudará a aumentar a eficiência das tecnologias de produção dos embriões. Apesar disso, em algum momento, nós encontraremos os limites ditados pela natureza (MERTON et al., 2003).

Em 1981, ocorreu o nascimento do primeiro bezerro obtido por PIVE, relatado por Brackett et al. (1982). Desde então, essa biotecnologia avançou, sendo responsável pelo nascimento de inúmeros produtos segundo Galli e Lazzari (1996).

Antes do advento da ultrassonografia, a laparoscopia paralombar (LAMBERT et al., 1986) permitiu o aproveitamento de oócitos de animais vivos. Callensen et al. (1987) relataram pela primeira vez o uso da ultrassonografia para a obtenção de oócitos bovinos, utilizando a técnica da punção ovariana transcutânea na região paralombar. Outra técnica proposta foi o uso da colpостomia para a recuperação de oócitos (HIRINCHS et al., 1990), que consistia na punção dos ovários por meio de uma incisão no fundo de saco vaginal, em éguas. No entanto, os riscos de peritonite e evisceração limitaram a evolução da técnica.

Pieterse et al. (1988) modificaram a técnica de punção transvaginal guiada por ultrassom, que havia sido proposta para humanos (LENZ et al., 1987) e passaram empregá-la na espécie bovina. Esta metodologia apresentou-se pouco invasiva e de alta repetibilidade (PIETERSE; WURTH, 1991) sendo posteriormente denominada “Ovum Pick-Up” (OPU). De acordo com Galli et al. (2001), as potenciais vantagens técnicas e econômicas levaram a uma rápida difusão da OPU entre os diversos grupos de pesquisa.

A OPU-PIVE surgiu como alternativa para atender à demanda por um procedimento para coleta dos COCs. A aspiração folicular foi rapidamente reconhecida como a técnica de eleição para atingir esse objetivo (GALLI et al., 2001). No início, os sistemas utilizados tinham baixa eficiência, pois a atenção era voltada para animais de alto valor genético, com problemas de fertilidade adquiridos ou com histórico de insucesso na superovulação, o que limitou a expansão do uso comercial da aspiração folicular (BOLS et al., 1995). A possibilidade de obtenção de embriões em situações de infertilidade, em que o acesso ao ovário estava preservado motivou vários grupos a utilizarem esse procedimento, originando o nascimento de várias crias (LOONEY et al., 1994).

Além de ser pouco invasiva, a OPU pode ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral das vacas e novilhas, sem que haja necessidade de pré-estimulação hormonal (BOUSQUET et al., 1999) e produzir embriões no início da gestação (MERTON et al., 2003) até o período em que for possível manipular os ovários sem que seja necessária uma tração exagerada dos mesmos.

A OPU proporciona, ainda, a possibilidade de colher oócitos em animais vivos, com a finalidade de investigação da competência do seu desenvolvimento (BOLS et al., 1997).

Porém a ativação espontânea do ciclo meiótico desde que o oócito é removido do folículo, alterações na dieta dos animais (ARMSTRONG, 2001) e alterações metabólicas no microambiente folicular (LEROY et al., 2008) são algumas limitações da OPU/PIV. Outro aspecto essencial para o sucesso da técnica é o preparo da equipe que desempenhará os trabalhos pois, após analisar 7800 sessões de OPU, Merton et al. (2003) demonstraram que a recuperação de oócitos depende, em particular, do técnico que manipula os ovários.

No Brasil, essa técnica alcançou uma posição de destaque. O desempenho da raça Nelore o fez se tornar líder na produção de embriões. Isto se deve a uma particularidade conferida às vacas zebuínas, que em geral apresentam maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas de raças europeias (THIBIER, 2004).

4.2 SELEÇÃO DE DOADORAS DE OÓCITOS

4.2.1 Categoria Animal

Em seus estudos, Rizos et al. (2005) concluíram que oócitos de vacas devem ser preferencialmente utilizados ao invés de oócitos oriundos de novilhas para maximizar a produção de blastocistos, devido à variação entre essas categorias animais. Foram observadas taxas de 8,1% de blastocistos em nulíparas e 12,4% em multíparas. Já entre as vacas seria preferível aspirar as não lactantes, uma vez que a lactação pode influenciar na quantidade e qualidade dos oócitos, devido à alterações metabólicas, limitando o número de embriões produzidos por sessão de OPU/PIVE (SNIJDERS et al., 2001).

4.2.2 População folicular

O sucesso das técnicas de OPU-PIVE é dependente da população folicular em fase antral (BONI et al., 1997). O número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta considerável variação, sendo o início de onda o momento mais favorável para a recuperação

de oócitos, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência de captação dos oócitos a partir de folículos menores (SENEDA et al., 2001), possibilitando assim o aumento na produção de embriões. Também interferem variáveis que afetam direta ou indiretamente a eficiência da maturação, fertilização e cultivo dos embriões (HENDRIKSEN et al., 2000).

A população de folículos antrais presentes nos ovários pode ser observada ao exame de ultrassom e considerada no momento de selecionar as doadoras. Em programas comerciais deve-se evitar a utilização de animais de baixo potencial, por terem uma limitada população de pequenos folículos antrais presentes nos ovários. Estudos recentes têm demonstrado que ovários de novilhas e vacas com baixas reservas (baixo número de folículos antrais) terão esse fenótipo por toda sua vida reprodutiva, o que é indesejado (IRELAND et al., 2011). Deve-se também levar em consideração a existência de animais de baixa resposta (menos de 10% das doadoras), que foram definidos como aqueles que tem menor resposta do que a média, após a superestimulação (DUROCHER et al., 2006).

Atualmente, a seleção de doadoras por população folicular ovariana pode ter início nos primeiros meses de vida, utilizando-se a avaliação da concentração do hormônio anti-muleriano (AMH), que segundo relatos recentes, pode possivelmente ser um marcador endócrino desta característica (RICO et al., 2009). Em fêmeas, o AMH é exclusivamente expresso nas gônadas após o nascimento. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o AMH participa em dois pontos críticos na seleção do desenvolvimento folicular: inibindo o recrutamento de folículos primordiais em um pool de folículos crescendo e também diminui a responsividade de folículos em crescimento ao FSH. (DURLINGER et al., 2002). Contudo, o melhor momento do ciclo estral para a coleta de amostra sanguínea para um prognóstico de alta confiabilidade ainda não está bem estabelecido (RICO et al., 2011). As concentrações de AMH circulantes tem sido positivamente correlacionadas com o número de folículos em mulheres (FANCHIN et al., 2003) e em animais *Bos taurus* e *Bos indicus* (BATISTA et al., 2014). De acordo com Monniaux et al. (2011), a mensuração da concentração circulante de AMH pode ajudar a prever respostas superovulatórias e a produção de embriões *in vivo*.

4.3 FISILOGIA OVARIANA

Sabe-se que a regulação do sistema endócrino da foliculogênese envolve as gonadotrofinas, vários hormônios produzidos localmente e fatores de crescimento

(FORTUNE et al., 2004). O aumento das concentrações de FSH sanguíneo precede o crescimento de 2 ou 3 ondas que ocorrem durante o ciclo estral bovino (ADAMS et al., 1992). Esse fato causa o crescimento de um grupo de folículos FSH-dependentes com diâmetros ≥ 3 mm. Nos dias seguintes um dos maiores folículos cresce (fase de crescimento) com maior rapidez e torna-se dominante, enquanto outros tornam-se subordinados (GINTHER et al., 1996). Em éguas, durante a fase que precede o estabelecimento da dominância os folículos crescem de uma forma parecida e qualquer um dos folículos tem a capacidade de adquirir a dominância (GASTAL et al., 2004). Quando o folículo dominante da primeira onda perde sua funcionalidade (fase de regressão) uma nova onda emerge.

A regressão luteal permite que o folículo dominante da segunda ou terceira onda permaneça funcional e seja acompanhado pelo aumento da frequência da pulsatilidade do LH resultando em um pico que inicia o final da maturação do folículo e do oócito e a ovulação do folículo dominante. Em geral os outros folículos não alcançam o estágio de ovulação e entram em atresia (HSUEH et al., 1994).

4.3.1 Fatores ligados ao folículo

Folículos de maior tamanho estão intimamente relacionados a oócitos também de maior tamanho e com um maior potencial de desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003; BAGG et al., 2007) e conforme a progressão do crescimento folicular, ocorre a gradual capacitação oocitária (HYTTEL et al., 1997).

Sabe-se que o diâmetro folicular no momento da recuperação de oócitos tem sido um dos critérios mais utilizados na tentativa de elevar os índices obtidos em sistemas de produção embrionária *in vitro* (VASSENA et al., 2003). Nesse sentido, folículos com diâmetro inferior à 2 mm disponibilizam oócitos que, após a FIV, originam embriões cujo desenvolvimento, muitas vezes não ultrapassa o estágio de oito células (TAN; LU, 1990). Estes oócitos parecem ter sido recuperados muito cedo e portanto provavelmente na ausência de alguns fatores foliculares e moleculares adicionais responsáveis por sinalizar os oócitos a adquirir sua competência completa (BLONDIN et al., 1997; MARCHAL et al., 2002). É importante enfatizar a importância da qualidade dos oócitos, sendo essencial no desenvolvimento embrionário de ótima qualidade. Da mesma forma, oócitos coletados de folículos dominantes

(>13 mm) produzem maiores índices de blastocistos quando comparado com oócitos de 3mm a 8 mm (HAGEMANN et al., 1999).

Lonergan et al. (1994) observaram que há indícios de que folículos maiores do que 6 mm apresentem oócitos de melhor competência no que diz respeito ao desenvolvimento até a fase de blastocisto. Com conclusões parecidas, Lequarre et al. (2005) verificaram que oócitos aspirados de folículos com diâmetro ≥ 6 mm têm maior competência do que oócitos de folículos < 4 mm.

Estimular o crescimento folicular é uma estratégia que pode ser utilizada em vacas *Bos taurus*, que apresentam menor resposta nos programas de OPU-PIVE. Esse fato pode ser relacionado à menor população ovariana de folículos antrais quando comparado ao animais *Bos indicus* (BATISTA et al., 2014) além de diversos aspectos adicionais relacionados principalmente a menor competência oocitária (AMBROSE et al., 1999; BARUSELLI et al., 2012).

Levando-se em consideração o momento do ciclo em que ocorreu a OPU, um estudo avaliou o número de blastocistos obtidos quando a aspiração era feita nos dias 3, 4 e 5 da primeira onda folicular. Três vezes mais embriões foram produzidos nas aspirações do dia 5, quando a dominância havia ocorrido em relação ao dia 3, quando os folículos estavam crescendo (MACHATKOVA et al., 2000).

Entretanto, segundo Hendriksen et al. (2004), oócitos recuperados antes da seleção do folículo dominante têm maior capacidade de desenvolvimento *in vitro* e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi maior quando os oócitos foram obtidos durante o crescimento folicular se comparado com o período de dominância (HAGEMANN, 1999; MACHATKOVA et al., 2004).

É interessante notar que ao iniciar o processo de atresia nos folículos, ocorrem sinais de apoptose nas células da granulosa, nas células do *cumulus* e finalmente o oócito (ZEUNER et al., 2003).

Além de levar em conta o tamanho do folículo como parâmetro que influencia a competência do oócito, têm sido utilizados muitos critérios morfológicos, ultra estruturais e metabólicos para prever a competência do oócito (BLONDIN et al., 2012). Estudos sugerem que a avaliação do metabolismo de amino-ácidos (BRISON et al., 2004) e a incidência de apoptose das células do *cumulus* (LEE et al., 2001) proporcionam alguns parâmetros relacionados à competência oocitária. Alterações metabólicas podem refletir no micro ambiente folicular, comprometendo a qualidade do oócito, alterando sua viabilidade ou até mesmo afetando a fisiologia do embrião (VAN HOECK et al., 2014).

Chiaratti e Meirelles (2010) observaram, que oócitos provenientes de folículos de menor diâmetro, contêm menos mtDNA do que os originados de folículos maiores. Em bovinos e camundongos, um mínimo número de cópias de mtDNA deve ser necessário para garantir o desenvolvimento normal enquanto a replicação de mtDNA não é reativada. Assim, parece lógico que quantidades insuficientes de mtDNA nos oócitos podem comprometer a produção de energia e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário subsequente.

4.3.2 Fatores associados aos oócitos

Segundo Watson (2007), a competência oocitária está relacionada com a habilidade do oócito em completar sua maturação, ser fertilizado com sucesso, atingir o estágio de blastocisto e poder originar uma progênie saudável. Estudos realizados têm demonstrado que a aquisição da competência é um processo que envolve inúmeros fatores (SIRARD et al., 2006).

O período de crescimento folicular, dominância, estendendo-se até momentos antes da ovulação é crítico para o desenvolvimento do potencial do oócito bovino (CHAUBAL et al., 2007) e de acordo com Machatkova et al. (2004), a competência dos oócitos é adquirida gradualmente e aumenta à medida em que ele aumenta seu tamanho.

A frequência das aspirações também influencia na qualidade e na quantidade dos oócitos recuperados. Ao remover um grupo de folículos > 2-3 mm de diâmetro haverá a indução do crescimento de novos folículos de 2-3 mm nos dias seguintes. O número de COCs é maior quando o intervalo entre as aspirações é de 7 dias em relação a 3 ou 4 dias. Já a qualidade dos COCs e a produção de embriões, é maior nas aspirações realizadas a cada 3 ou 4 dias. Esse fato está de acordo com a hipótese de que o folículo dominante exerce um efeito negativo na qualidade do oócito (MERTON et al., 2003). Os COCs proporcionam um contato entre as células somáticas e o oócito e durante o processo de maturação ocorre sua expansão, associada à uma melhor qualidade embrionária e maior potencial de implantação (VEECK et al., 1999).

Ainda, segundo Sirard et al. (2006), o desenvolvimento da habilidade do oócito é adquirida pela biossíntese de moléculas que são o resultado de processos que ocorrem no núcleo e no ooplasma durante o desenvolvimento e a maturação oocitária assim como a re-localização de

diferentes organelas celulares, sendo a mitocôndria de maior destaque, já que alterações na organização mitocondrial é uma fiel indicação de remodelamento citoplasmático assim como aquisição de competência oocitária essenciais para o desenvolvimento embrionário (BAVISTER; SQUIRRELL, 2000). Essas modificações correm de forma constante do estágio primordial até a ovulação e segundo Fair et al. (1995), o oócito vai aos poucos diminuindo suas atividades transcricionais.

Outro fator que interfere na qualidade oocitária é a concentração de progesterona presente na corrente sanguínea (HAGEMANN, 1999; HENDRIKSEN et al., 2004). A progesterona parece melhorar a competência oocitária (BLONDIN et al., 1997) já que oócitos recuperados no final do diestro foram mais competentes do que oócitos aspirados no início do desenvolvimento do corpo lúteo (MACHATKOVA et al., 2004). Uma questão importante é o quanto deve se estender a concentração de progesterona antes do estabelecimento da dominância. Nesse sentido, experimentos tem sido feitos para determinar como e em que esquema de tratamento a progesterona pode afetar a fertilidade (AUSTIN et al., 1999; SHAHAM-ALBALANCY et al., 2000).

4.4 HORMÔNIOS FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) E LUTEINIZANTE (LH)

Os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) são gonadotrofinas e iniciam sua ação sinalizando células-alvo do ovário, ligando-se aos receptores, de origem proteica, acionando vias complexas de expressão gênica. Com estímulo apropriado do FSH e LH os folículos produzem hormônios que promovem o desenvolvimento de características sexuais secundárias e regula o eixo hipotalâmico-hipofisário, assim como a receptividade uterina (KNOBIL; NEILL, 2006). Além das gonadotrofinas, peptídeos sintetizados localmente desempenham papel chave na regulação da fase antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos quanto endócrinos (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

O contínuo processo de crescimento e atresia dos folículos que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (LUCY et al., 1992).

Cada onda folicular é composta por uma fase de recrutamento, no qual um grupo de folículos primordiais e primários inicia seu crescimento. Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode chegar a ovular (fase de seleção). O folículo selecionado passa a exercer dominância (fase de dominância) sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibinas, inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (GINTHER et al., 1989, 1996; SIROIS; FORTUNE, 1994).

O aumento das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento e emergência da onda folicular (ADAMS et al., 1992). Os folículos são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância, após o que eles se tornam dependentes de LH (FORTUNE et al., 2001).

Apesar de a ligação do FSH ao seu receptor ser restrita às células da granulosa, estudos mais recentes demonstraram a presença destes receptores também em oócitos, sugerindo um efeito adicional do hormônio no ovário (MÉDURI et al., 2002). O FSH estimula a transcrição de genes que codificam moléculas sinalizadoras no meio intracelular como os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que têm mostrado ser críticos na formação do antro, na proliferação das células da granulosa, na produção de estrógeno e no aumento da vascularização da camada de células da teca (SASSON et al., 2003; ZIMMERMANN et al., 2003).

Utilizando Microarranjo de oócitos, dados revelaram que o FSH promove a expressão de um grande número de genes incluindo os envolvidos na reorganização de microtubulos e citoesqueleto de actina e tubulina, cadeia pesada da kinesina e tropomiosina (SASSON et al., 2003; GRIESHABER et al., 2003).

Esses resultados indicam que a resposta das células da granulosa ao FSH envolve um programa complexo e coordenado de expressão gênica que compreende, provavelmente centenas de genes (HENNEBOLD et al., 2000; GRIESHABER et al., 2003).

Existem evidências de que o estradiol atua como um facilitador local para a mudança na responsividade do maior folículo do FSH para o LH no momento que ocorre queda na concentração sérica de FSH (GONG et al., 1996).

A interação do FSH com seu receptor inicia uma cadeia de reações intracelulares que incluem a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas (HUNZICKER-DUNN; MAIZELS, 2006), tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de estereoides e a expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1) e LH (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

4.5 PROTOCOLOS PARA OPU

4.5.1 Sincronização da onda de crescimento folicular

Em bovinos, o crescimento de folículos antrais está bem caracterizado pela presença de ondas de crescimento folicular durante cada ciclo estral, as quais já são observadas antes mesmo da puberdade e durante os períodos de anestro (ADAMS, 1999; IRELAND et al., 2000). A OPU pode ser realizada no ciclo natural, sem o uso de FSH (GALLI et al., 2004; Merton et al., 2012) ou sincronizando a emergência da onda folicular com objetivo de remover o efeito supressivo do folículo dominante e iniciar uma nova onda (BÓ; ADAMS; MAPLETOFT, 2000). Para atingir esse objetivo, os tratamentos com progesterona e estrógenos têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento e a emergência de uma nova onda folicular pela ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH e LH (BÓ et al., 1994, 2006).

Outra alternativa para sincronizar a onda seria a remoção do folículo dominante da onda como alternativa ao uso de estrógenos, que não podem ser utilizados em vários países (MERTON et al., 2003), que se mostra pouco prático de dependente de mão-de-obra especializada.

Uma vez sincronizada a onda, o FSH exógeno pode ser utilizado para recrutar maior número de folículos para continuarem o crescimento além de 5 mm de diâmetro, em um mecanismo dose-dependente, uma vez que o tratamento com pequenas quantidades de FSH exógeno pode induzir codominância (ADAMS et al., 1993; RIVERA; FORTUNE, 2001).

4.5.2 Superovulação

Diversos grupos reportaram a ocorrência de efeito positivo da estimulação com FSH, previamente à OPU, sobre a qualidade dos oócitos recuperados e a competência de

desenvolvimento dos COCs (BLONDIN et al., 1997; BOUSQUET et al., 1999; GOODHAND et al., 1999; MERTON et al., 2003; SENDAQ et al., 2008; BLONDIN et al., 2012).

Em vacas *Bos taurus*, essa indução hormonal é normalmente usada antes do estabelecimento da dominância com 8,5 mm de diâmetro folicular em (GINTHER et al., 1997), permitindo o crescimento de uma população homogênea de folículos (GINTHER et al., 2000; MERTON et al., 2003).

Doadoras superovuladas podem ser aspiradas 1 vez a cada 2 semanas, com boas taxas na produção de blastocistos. Se, eventualmente não respondem ao FSH adequadamente, têm a opção de serem aspiradas no ciclo natural (BLONDIN et al., 2012), em dia aleatório do ciclo estral ou com a onda sincronizada.

Goodhand et al. (1999) reportaram aumento da taxa de produção embrionária de 22 para 39%, após a pré-estimulação com doses decrescentes de FSH, por 3 dias antes da OPU, em novilhas Simental. Merton et al. (2003) observaram que a pré-estimulação com FSH resultou em maior número de oócitos recuperados e de embriões produzidos por sessão de OPU.

Dentre vários esquemas possíveis Chaubau et al. (2007) concluíram que o tratamento com múltiplas aplicações de FSH foi mais eficiente, aumentando o número de folículos aspirados do que quando utilizaram uma aplicação única, que também foi adequada para promover a superestimulação ovariana. Já Sendaq et al. (2008), compararam o efeito estimulatório entre 500 UI de FSH (4 doses constantes com intervalo de 12h) e 3000 UI de eCG previamente à OPU notando que o primeiro tratamento resultou em maior número de oócitos de boa qualidade e menor número de oócitos de baixa qualidade, em relação ao segundo.

É importante notar que nem todo animal responde da mesma forma aos protocolos de superovulação. Ainda há dúvidas sobre o melhor protocolo de uso de FSH para esse fim, uma vez que há grande variação na dosagem, no número de aplicações, no momento das aplicações e no intervalo entre a última administração de FSH e a OPU “*coasting period*”.

Blondin et al. (2012), em um esquema comercial, relatou que em 64 sessões de OPU-PIVE realizadas em 2010 e 2011, doadoras não-superovuladas produziram 23% de blastocistos contra 56% obtidos de animais superovulados, submetidos ao “coasting”. As baixas taxas de blastocistos estão correlacionas com os menores diâmetros dos folículos aspirados no momento da OPU.

Na tentativa de melhorar os resultados na PIVE em vacas leiteiras, a utilização de protocolos superestimulatórios em doadoras de oócitos adultas utilizando FSH previamente à OPU-PIVE pode ser considerada como uma alternativa (GOODHAND et al., 1999; SENDAG

et al., 2008). Vieira et al. (2014b) reportaram aumento na PIVE em vacas lactantes (VL) e não lactantes (VNL) da raça Holandesa após tratamento de superestimulação [VL (controle: $1,0 \pm 0,4$; FSH: $1,5 \pm 0,5$); VNL (controle: $2,7 \pm 0,6$; FSH: $4,4 \pm 0,8$); $P=0,01$]. Ainda os mesmos autores têm desenvolvido estudos na tentativa de reduzir o número de tratamentos necessários (aplicações intramusculares de FSH). Desta forma outros estudos avaliaram o efeito da superestimulação das doadoras de ooócito com diferentes doses de FSH (Folltropin - Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) diluído em veículo de liberação lenta, ácido hialurônico (MAP5 - Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada). Verificou-se a dose de 200mg de Folltropin associado ao MAP5 foi suficiente para obter resultados superiores no programa de PIVE em vacas não lactantes da raça Holandesa (SILVEIRA et al., 2014).

4.5.3 “Coasting period”

Em protocolos de superestimulação folicular, “coasting” significa não realizar a aplicação de FSH na presença do LH endógeno (GINTHER et al., 1998) para estimular o final da diferenciação folicular e da competência do oócito (SHER et al., 1995; BLONDIN et al., 2002). Esta abstinência de gonadotrofina exerce uma pressão seletiva para eliminar os folículos pequenos e aumentar a proporção de folículos médios para grandes (FLUKER et al., 1999; BLONDIN et al., 2002).

Foi sugerido que esse período é importante para a indução de alterações das COCs que correspondem àquelas que ocorrem durante as fases iniciais de atresia e semelhantes aos processos que ocorrem durante a pré-maturação oocitária (BLONDIN et al., 1997).

Além da estimulação do crescimento de um grupo de folículos até o diâmetro >5 mm, essa abstinência deve induzir uma leve atresia nas camadas de fora do cumulus melhorando a competência dos oócitos (BLONDIN et al., 1997).

Segundo Nivet et al. (2012), a janela do “coasting” é bem larga (20 a 92 h) devido à variação entre as diferentes doadoras. Em seus estudos, concluiu-se que 54h foi um período ideal. Já Blondin et al. (2012), utilizou 6 injeções de FSH realizando-se a OPU 43 h após a última aplicação. Na maioria dos casos, este protocolo favoreceu alta proporção de folículos em torno de 7 a 10 mm de diâmetro e de oócitos competentes. Contudo, em algumas doadoras, foram realizadas modificações no tamanho do “coasting period” e/ou número de aplicações de injeções de FSH, no sentido de produzir maior proporção de folículos em torno

de 7 a 10 mm. Ainda, segundo Blondin et al. (2012) em sua utilização comercial, 77% das doadoras mostraram uma ótima duração do “coasting period de 43 h, enquanto que 10% mostraram melhores resultados com 30 h de “coasting” e 15% responderam melhor com 54 h de “coasting”. No presente caso, o protocolo de superovulação padrão é aplicado pelo menos em duas sessões de FIV para confirmar a necessidade de modificação e cada animal é monitorado cuidadosamente para determinar o protocolo ideal a ser utilizado nas futuras sessões.

Deve-se ter em conta que podem ocorrer variações entre as sessões de OPU/PIVE quanto a resposta à superovulação no mesmo animal e existem vários fatores que podem interferir na produção de embriões. Identificar a “janela” ideal para aquisição da competência é o verdadeiro desafio nos protocolos de superestimulação utilizando FSH (BLONDIN et al., 2012).

Vários estudos fornecem evidências de efeito positivo de se realizar na abstinência do FSH antes da realização da OPU, a maioria deles realizados em condições de clima temperado, diferentemente do que é encontrado no Brasil. Sabe-se que os oócitos apresentam grande sensibilidade ao estresse térmico, com consequências devastadoras à fertilidade (HANSEN 1999; FERREIRA, 2011). Nesse sentido, estudos sobre a vantagem do uso deste pré-tratamento com FSH para a OPU estão sendo conduzidos nestas condições. Recentemente, foi realizado no Brasil um estudo para avaliar o efeito do estímulo com quatro doses decrescentes de FSH (D4 manhã e tarde = 57 mg e D5 manhã e tarde = 43 mg de Folltropin, sobre a eficiência da OPU-PIVE de vacas Holandesas (VIERA et al., 2013). Nesse estudo, o uso do FSH, com “coasting period” de 40 horas, resultou em aumento do número de folículos médios (6 a 10 mm) e redução do número de folículos pequenos (< que 6 mm), presentes nos ovários no dia da OPU. Além disso, maior taxa de blastocistos (31,3% vs 52,8%) e maior número de embriões viáveis ($2,7 \pm 0,6$ vs $4,4 \pm 0,8$) foram obtidos em vacas não lactantes tratadas com FSH.

Recentemente foi demonstrado pela primeira vez que em um intervalo prolongado, de 92 horas entre a última aplicação de FSH e o início da aspiração folicular, os folículos eram grandes, mas ainda cresciam contendo oócitos associados com o declínio da competência. (NIVET et al., 2012). Este trabalho também demonstrou que uma alta taxa de produção de embriões foi obtida quando os folículos eram >7 mm, após a superestimulação com FSH combinado com um curto período de restrição entre a última aplicação de FSH e o início da aspiração folicular (44 a 68 h).

Assim, o presente estudo tem como objetivo principal incrementar o conhecimento sobre o uso de FSH previamente à OPU-PIVE (número, dosagem e momento de aplicações) e aperfeiçoar o tratamento para melhorar a eficiência desta biotécnica.

4.5.4 Remoção do corpo lúteo

Outra estratégia que pode ser interessante para aumentar a recuperação oocitária em procedimentos de OPU é a regressão do corpo lúteo, com o intuito de liberar espaço no ovário, para a visualização de maior quantidade de folículos. Além disso, vacas tratadas com prostaglandina (PGF), nove ou dez dias após o cio, seguido de sincronização da emergência da onda folicular (baixa concentração de progesterona durante o tratamento com FSH) tiveram maior número de folículos, em comparação com vacas submetidas ao mesmo tratamento, em concentrações crescentes de progesterona, no início do ciclo estral (EL-SHERRY et al., 2010). Mesmo considerando-se que a progesterona é importante para o *turn over* folicular, há evidências das vantagens da ausência do corpo lúteo no crescimento folicular final e na OPU. A proposta do presente estudo é induzir a luteólise, em momento que não atrapalhe o *turn over* folicular e que garanta a redução da presença de CL no momento da OPU.

5 JUSTIFICATIVA

O sucesso das técnicas de OPU-PIVE está relacionado com a quantidade e a qualidade dos oócitos para a produção *in vitro* e embriões.

Sabe-se que o diâmetro folicular no momento da OPU está relacionado com a qualidade do oócito. A utilização do FSH em vacas doadoras de oócitos proporciona um grande número de folículos com diâmetro entre 6 e 10 mm, o que melhora a competência dos oócitos recuperados e a produção de embriões.

No entanto, existem vários protocolos, com diferentes dosagens hormonais, esquemas de aplicação e diferentes períodos de abstinência, entre a última aplicação de FSH e o início da OPU. Desta forma, objetivou-se testar um protocolo que levasse a uma melhor taxa de produção de embriões.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 EXPERIMENTO

6.1.1 Local de Execução

O experimento foi conduzido na Fazenda Santa Maria, localizada em Pouso Alegre, Sul de Minas Gerais, especializada na produção de leite em vacas da raça Holandesa e comercialização de animais e embriões.

6.1.2 Animais

Todas as vacas do presente experimento encontravam-se não lactantes e foram mantidas em piquetes com pastagem e água *ad libitum*, além de suplementação com 2 kg de concentrado contendo 12% de proteína e mistura mineral à vontade. Essas vacas já eram doadoras de oócitos antes do experimento, sendo submetidas, mensalmente, à OPU, em dia aleatório do ciclo estral. Os animais utilizados apresentavam Escore da Condição Corporal (ECC) de $3,4 \pm 0,1$, em uma escala de 1 a 5. Para avaliação do ECC utilizou-se o sistema de pontuação de 1 a 5 (1 = muito magra e 5 = obesa), descrito por Ferguson et al. (1994).

6.1.3 Delineamento Experimental e tratamentos

Trinta e seis vacas da raça Holandesa, não lactantes (período seco) e não gestantes, foram homogeneamente divididas em 3 grupos experimentais (controle e tratado com 4 ou 6 administrações de FSH). Para possibilitar uma distribuição equitativa das vacas nos grupos de

tratamento, foi considerado o ECC e histórico de produção de oócitos e embriões das doadoras, pois as mesmas participavam de um programa comercial de PIVE.

Em dia aleatório do ciclo estral, definido como D0, todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (Primer, Tecnopec, São Paulo, Brasil), associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (Ric-BE, Tecnopec, São Paulo, Brasil). As vacas do grupo controle, (n = 12) não receberam aplicação de FSH. Já as vacas do grupo 4 FSH (n = 12) receberam 200 mg de FSH, nos dias D4 e D5, divididos em quatro doses iguais de 50 mg cada, em intervalos de 12 h. Nos D3, D4 e D5, as vacas do grupo denominado 6 FSH (n = 12) receberam 200 mg de FSH (Folltropin, Tecnopec, Brasil), divididos em seis doses de 33,3 mg administradas com intervalos de 12 h. As vacas dos três grupos foram tratadas com PGF2 α (Cioprostinn[®], Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda, Monte Aprazível, SP, Brasil) no D3 de manhã e foram submetidas à OPU no D7, logo após a retirada do dispositivo de progesterona. Todas as vacas passaram por todos os tratamentos, sendo submetidas a OPU mensais, totalizando três aspirações foliculares ou três réplicas. Os grupos experimentais estão ilustrados na figura 2.

Ao final do experimento 5 animais foram excluídos por razões comerciais.

Previamente a cada sessão de OPU, foi verificada a presença de CL, e cistos ou folículos com diâmetro de pelo menos 20 mm de diâmetro (VANHOLDER et al., 2006). Também foi realizada a contagem de folículos pequenos (< 6 mm), médios (6 a 10 mm) e grandes (>10 mm) em cada um dos ovários.

Figura 2 - Delineamento experimental

Grupo controle (n = 12) **Grupo 4 doses de FSH (n = 12)** **Grupo 6 doses de FSH (n = 12)**

*FSH – dose total de 200 mg divididos em 4 aplicações iguais de 50 mg.

** FSH – dose total de 200 mg divididos em 6 aplicações iguais de 33,33 mg.

AM = Manhã; PM = Tarde.

Fonte: (SILVA et al., 2014)

6.1.4 Ovum-pick-up (OPU)

O procedimento de OPU foi realizado conforme a técnica modificada de humanos para a espécie bovina, descrita por Pieterse et al. (1988), utilizando-se o aparelho de ultrassom Mindray (Mindray® China) equipado com transdutor micro-convexo de 5MHz. Os oócitos foram recuperados por aspiração folicular transvaginal.

Foi realizada a tricotomia entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea, seguida de anestesia epidural com 5 ml de lidocaína 2% (Lidovet: Bravet, RJ, Brasil). Os folículos visualizados no monitor, foram contados, para posterior avaliação da taxa de recuperação e classificados em pequenos (≤ 6 mm), médios (entre 6 e 10 mm) e grandes (≥ 10 mm). Agulhas descartáveis de 20 Gauge acopladas a um mandril e conectadas a uma mangueira de polietileno atingiram o fundo de saco vaginal. Após fixar o ovário contra o transdutor por manipulação retal, a agulha alcançou os folículos, atravessando a parede vaginal e aspirando o fluído folicular.

Os COCs, foram removidos utilizando-se a pressão negativa gerada por uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). A pressão utilizada variou de 65 a 70 mm Hg (15 a 20 ml de solução /min), suficiente para recuperar a maior quantidade de COCs, sem comprometer sua qualidade, principalmente no que diz respeito ao número de camadas de células do *cumulus* ao redor dos oócitos.

O conteúdo proveniente dos folículos aspirados foi armazenado em um tubo cônico de 50 ml (Corning, Corning, NY, EUA) conectado ao sistema com o auxílio de uma rolha metálica (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Foi utilizado o meio Dulbecco (PBS) acrescido de heparina sódica (10 UI / ml) na solução utilizada para lavagem para evitar a formação de coágulos no sistema de aspiração. A solução resultante da aspiração completa foi transferida para um filtro de colheita de embriões com malha de 75 micra (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), imediatamente lavado com solução de PBS, sem heparina, para melhorar as condições de visualização dos oócitos, antes de se colocar o lavado na placa de Petri (90 x 15).

6.1.5 Produção In Vitro de Embriões (PIVE)

Na placa de Petri, após a sedimentação, os COCs foram localizados e removidos, utilizando-se uma lupa estéreo microscópica (Nikon, SMZ-445). Em seguida, os COCs foram classificados como grau I, II III, desnudos, atrésicos, com citoplasma irregular (CI) ou degenerados, observando-se o número de camadas e o grau de compactação ou expansão das células do *cumulus*, assim como a morfologia, homogeneidade e integridade do citoplasma (MANUAL DA IETS 1998).

Os COCs classificados como grau I, II e III foram considerados como viáveis. Além deles, foram enviados para a PIVE os oócitos desnudos e CI.

a) Maturação In Vitro (MIV)

Ainda na fazenda, os COCs selecionados como viáveis, acrescidos de estruturas classificadas como CI e desnudos foram colocados no meio de maturação e enviados ao laboratório, sob óleo mineral, em tubos de vidro de 5 ml que receberam uma mistura gasosa com 5% de CO₂ e 95% de N₂ por 15 segundos. Os tubos foram vedados e colocados na transportadora de oócitos (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) a 38°C.

O meio de maturação consistiu em TCM-199 (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com Hepes, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Os COCs foram transferidos dos tubos para a incubadora, onde foram mantidos o tempo suficiente para completar 24 h de maturação (38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima), sob óleo mineral em gotas de 100 µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, um µg/mL FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canadá), 50 µg/mL hCG (ProfasiTM, Serono, São Paulo, Brasil) e estradiol (1 µg/mL), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina.

b) Preparo do sêmen e Fertilização in vitro (FIV)

A FIV foi realizada com sêmen sexado de touros da raça Holandesa, distribuídos de forma aleatória, descongelado (36°C por 30 s) e lavado duas vezes por centrifugação (600 rpm por 5 min), a 30°C, em 2 ml de meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes. A seleção dos espermatozoides seguiu o

método de Gradiente de Percoll, usando 2 ml de Percoll 45% e 2 ml de Percoll de 90% (PARRISH et al., 1995).

A concentração do sêmen foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides (sptz) móveis/mL. O volume de quatro microlitros de sêmen (10^5 sptz) foi adicionado em cada gota de 90 µL de TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina) sob óleo mineral. Posteriormente, foram adicionados 25 a 30 oócitos em cada gota.

O período de co-incubação foi de 20-24 h em incubadora a 38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima. Após esse período, as células do *cumulus* e o excesso de espermatozoides foram removidos por agitação em vórtex, lavados uma vez com meio de cultivo de fluido sintético de oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOFaa) e colocados na gota final de cultivo.

c) Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos foram co-cultivados (grupos de 25) na incubadora (38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima) com células da granulosa em gotas de 100 µL de SOF (WELLS et al., 1999) 2,5% SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“*feeding*”). O meio de cultivo do “*feeding*” foi o mesmo meio do início do cultivo.

A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia de cultivo (D3), quando o embrião está com 8 a 16 células. A taxa de produção de embriões foi avaliada 7 dias após o início do cultivo.

6.1.6 Doppler

A hemodinâmica overiana foi avaliada, antes da OPU, utilizando-se um aparelho de ultrassonografia Doppler com probe linear transretal de 6,5 mHz (M5vet, Mindray®, China) no modo doppler, durante a segunda réplica, momentos antes da OPU.

O modo color Doppler foi utilizado para a avaliação subjetiva da vascularização dos ovários, sendo classificado em escores de 0 a 4, de acordo com a imagem obtida de cada ovário (Figura 3), sendo 0 (zero) referente à vascularização mínima e 4 (quatro) à

vascularização máxima, adaptado de Silva e Ginther (2010). As imagens foram acompanhadas por 10 a 15 segundos em cada ovário, gravadas e analisadas por dois avaliadores diferentes. Para a análise estatística utilizou-se a média das duas avaliações. Para a obtenção das imagens, foi realizado o escaneamento dos ovários direito (OD) e esquerdo (OE), de modo a obter a imagem com a probe localizada sobre o ovário.

Figura 3 - Imagem ultrassonográfica (6,5 mHz), dos ovários bovinos para avaliação subjetiva da vascularização, em modo Color Doppler do aparelho M5vet, Mindray, classificada em escores de 0 a 4. A. Escore 1, B. Escore 2, C. Escore 3, D. Escore 4

Fonte: (SILVA, J. C. B., 2014).

6.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3 (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A variável independente incluída no modelo foi tratamento (Controle, 4FSH e 6FSH). A contagem folículos antrais, no momento da OPU foi utilizada para a criação de 2 classes de população (acima e abaixo da média de folículos que foi de 52 folículos) sendo a classe de população de folículos antrais mantida como covariável para efeito das análises estatísticas. O efeito animal dentro de cada sessão de aspiração folicular foi considerado como efeito aleatório. As variáveis-resposta foram número de folículos pequenos, médios e grandes, presença de cisto, presença CL no momento da OPU, taxa de recuperação (número de oócitos totais / número total folículos pequenos, médios e grandes), número de oócitos totais, número e taxa de viáveis (número de oócitos viáveis / número de oócitos totais), número de desnudos, número de atrésicos, número de CI, número de oócitos enviados para a FIV, número de estruturas clivadas, taxa de clivagem (número de estruturas clivadas / oócitos enviados para a FIV), número e taxa de embriões D7 (número de embriões / número de oócitos enviados para FIV). Para a análise, a distribuição binomial foi assumida para as variáveis resposta categóricas. Os dados contínuos foram analisados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias utilizando “Guided Data Analysis”, e transformados quando necessário. A comparação das médias foi analisada por contrastes ortogonais. O contraste 1 (C1) avaliou o efeito do tratamento superestimulatório, independentemente do número de aplicações de FSH [C1 = Controle x (4FSH + 6FSH)]. E o contraste 2 (C2) avaliou o efeito do número de aplicações de FSH para o tratamento superestimulatório (C2 = 4FSH X 6FSH).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ou porcentagem. Análises com valor de $P \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente diferentes.

7 RESULTADO

Nenhuma das variáveis-resposta foi influenciada pela interação entre tratamentos e classe de população folicular, com base no número de folículos antrais; portanto os resultados serão apresentados com base nos efeitos principais.

7.1 POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS ANTRAIS (PFA)

A população de folículos antrais (PFA) foi analisada como covariável.

O grupo controle apresentou $53,3 \pm 4,9$ e o tratado $51,4 \pm 3,1$ folículos no momento da OPU. Não houve efeito entre os tratamentos Controle x FSH ($P = 0,89$) e nem entre Classes (FSH4 x FSH6; $P = 0,59$).

Na tabela 1 encontram-se as médias das variáveis respostas em função da classe de população folicular.

Tabela 1 - Efeito da população de folículos antrais sobre as variáveis ovarianas relacionadas à produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas não lactantes com onda folicular previamente sincronizada, onde BP significa baixa população de folículos (≤ 52 folículos) e AP significa alta população de folículos antrais (>52 folículos).

	Média BP $\pm$ Erro Padrão da Média	Média AP $\pm$ Erro Padrão da Média	Valor de P
Número total de oócitos	12,2 $\pm$ 0,6	28,1 $\pm$ 1,3	< 0,0001
Número de oócitos viáveis	7,7 $\pm$ 0,5	19,6 $\pm$ 1,1	< 0,0001
Taxa de oócitos viáveis	63,41%	69,59%	0,098
Número de oócitos com CI	2,0 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,6	< 0,0001
Número de oócitos enviados para FIV	10,2 $\pm$ 0,6	26,0 $\pm$ 1,2	< 0,0001
Número de estruturas clivadas no D3	6,5 $\pm$ 0,52	16,8 $\pm$ 0,9	< 0,0001
Taxa de clivagem no D3	64,0%	64,6%	0,524
Número de embriões D7	3,1 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,6	< 0,0001
Taxa de embriões D7	30,3%	22,6%	0,075

7.2 VARIÁVEIS FOLICULARES

No momento da OPU, o número de folículos pequenos, médios e grandes das vacas dos grupos controle e tratados com FSH foi contabilizado. Maior número de folículos pequenos ($P < 0,0001$) foi observado nas vacas controle e maior, número de folículos médios ($P < 0,0001$) foi observado nos ovários das vacas tratadas com FSH, independentemente do número de administrações deste fármaco (Tabela 1). Quando as vacas tratadas com FSH foram confrontadas (4FSH x 6FSH) houve tendência ($P = 0,067$) de haver maior número de folículos médios naquelas do grupo 4FSH (Tabela 2). O número de folículos grandes, no

entanto, não foi influenciado pelo tratamento com FSH ($P = 0,24$) nem tampouco pelo número de administrações deste fármaco ($P = 0,88$; Tabela 2).

A proporção de folículos pequenos apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,0001$) e entre as classes de PFA ($P = 0,0002$). O mesmo ocorreu com a proporção de folículos médios ($P < 0,0001$) para tratamentos e ($P = 0,005$) para PFA. A proporção de folículos grandes não apresentou diferença entre os tratamentos ($P = 0,47$), mas sim entre classes de PFA ($P < 0,0001$).

Tabela 2 - Efeito da adição e do número de aplicações de FSH em protocolos de sincronização da emergência de onda folicular sobre variáveis foliculares, luteínicas e circulatórias: número de folículos pequenos (< 6 mm), médios (6 a 10 mm) e grandes (>10 mm), porcentagem de vacas com cisto ovariano, porcentagem de vacas com corpo lúteo (CL) e a vascularização ovariana (escala de 1 a 5) no dia da OPU de vacas Holandesas não lactantes. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

	Número de folículos				Vacas com cisto	Vacas com CL	Taxa de recuperação
	Pequenos	Médios	Grandes	Total			
Efeito da adição de FSH							
Controle (n = 35)	46,3 ± 5,1	5,2 ± 0,5	1,7 ± 1,0	53,2 ± 4,5	42,9%	17,1%	36,5%
FSH (n = 66)	31,0 ± 2,4	18,1 ± 1,4	2,3 ± 0,5	51,4 ± 3,1	37,9%	19,7%	36,0
Valor de P	< 0,0001	< 0,0001	0,240	0,89	0,610	0,779	0,476
Efeito do nº de aplicações							
4 FSH (n = 33)	30,4 ± 3,3	20,0 ± 2,0	2,2 ± 0,5	52,6 ± 4,5	39,4%	18,2%	36,4%
6 FSH (n = 33)	31,5 ± 3,4	16,2 ± 1,9	2,5 ± 0,9	50,1 ± 4,3	36,4%	21,2%	35,5%
Valor de P	0,275	0,067	0,883	0,29	0,774	0,776	0,695

No presente estudo, não foi detectado efeito de tratamento com FSH sobre a presença de cistos ovarianos ($P = 0,61$) e CL ($P = 0,779$; Tabela 1), no dia da OPU.

A taxa de recuperação dos oócitos foi semelhante entre os grupos controle e tratados ($P = 0,48$).

7.3 VARIÁVEIS OOCITÁRIAS

Ao analisar o efeito do tratamento com FSH em relação às variáveis oocitárias não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle e tratados. As variáveis analisadas foram: total de oócitos recuperados, oócitos viáveis, taxa de viáveis, oócitos com citoplasma irregular (CI), desnudos e atresícos.

O grupo controle apresentou $19,5 \pm 1,6$ e $12,6 \pm 1,3$ oócitos totais e viáveis, com taxa de recuperação de 64,6% versus $18,5 \pm 1,3$ ($P = 0,555$) e $12,70 \pm 1,03$ ($P = 0,606$), com taxa de recuperação de 68,7% (0,154), no grupo tratado com FHS. O número de CI ($P = 0,085$), desnudos ($P = 0,311$) e atresícos (0,282) também foram analisados.

Ao confrontar as vacas controle vs tratadas (FSH4 e FSH6), não houve diferença significativa para as variáveis citadas acima, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Efeito da adição e do número de aplicações de FSH em protocolos de sincronização da emergência de onda folicular sobre o número de oócitos totais, viáveis (graus I, II e III), desnudos, atrésicos e com citoplasma irregular (CI) provenientes da OPU de vacas Holandesas não lactantes. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Oócitos								
	Totais		Viáveis		Taxa de viáveis	Desnudos	Atrésicos	CI
Efeito da adição de FSH								
Controle (n=35)	19,5 1,64	$\pm$	12,6 1,26	$\pm$	64,6%	0,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,6
FSH (n=66)	18,5 1,27	$\pm$	12,7 1,03	$\pm$	68,7%	0,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,3
Valor de P	0,555		0,606		0,154	0,311	0,282	0,085
Efeito do nº de aplicações								
4 FSH (n=33)	19,1 $\pm$ 1,9		13,21 1,51	$\pm$	69,0%	0,61 $\pm$ 0,21	2,15 0,15	$\pm$ 3,18 $\pm$ 0,49
6 FSH (n=33)	17,8 $\pm$ 1,7		12,9 1,42	$\pm$	68,5%	0,45 $\pm$ 0,13	2,12 0,22	$\pm$ 3,00 $\pm$ 0,47
Valor de P	0,48		0,6		0,9	0,66	0,93	0,88

7.4 PIVE

Analisando as variáveis relacionadas à produção de embriões, quantidade de oócitos enviados para a FIV, número de estruturas clivadas, taxa de clivagem, número de embriões produzido no D7 e taxa de produção de embriões, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratados, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da adição e do número de aplicações de FSH em protocolos de sincronização da emergência de onda folicular sobre o número de oócitos encaminhados para a FIV (graus I, II, III, leve grau de atresia e de CI), número e taxa de estruturas clivadas (D3 pós-FIV) e de embriões produzidos (D7 pós-FIV). Os oócitos foram provenientes da OPU de vacas Holandesas não lactantes. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

	Oócitos enviados para FIV	Estruturas Clivadas D3	Taxa de Clivagem D3	Número de Embriões D7	Taxa de Embriões D7
Efeito da adição de FSH					
Controle (n=35)	17,5 $\pm$ 1,6	11,2 $\pm$ 1,3	63,8%	4,1 $\pm$ 0,5	23,5%
FSH (n=66)	16,3 $\pm$ 1,3	10,5 $\pm$ 1,8	64,5%	4,3 $\pm$ 0,5	26,4%
Valor de P	0,34	0,85	0,48	0,79	0,42
Efeito do nº de aplicações					
4 FSH (n=33)	17,0 $\pm$ 1,9	10,5 $\pm$ 1,0	61,7%	4,2 $\pm$ 0,5	24,8%
6 FSH (n=33)	15,7 $\pm$ 1,7	10,6 $\pm$ 1,3	67,5%	4,4 $\pm$ 0,8	28,2%
Valor de P	0,49	0,92	0,50	0,68	0,99

7.5 VASCULARIZAÇÃO OVARIANA

Não houve efeito do tratamento entre os grupos controle e tratado com FSH ($P = 0,43$) hemodinâmica ovariana nem entre os grupos tratados com FSH4 e FSH6 ($P = 0,67$), conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Efeito da adição e do número de aplicações de FSH em protocolos de sincronização da emergência de onda folicular sobre o escore de vascularização ovariana (escala de 0 a 4) em vacas Holandesas não lactantes. Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

	Escore de vascularização ovariana
Efeito da adição de FSH	
Controle	1,7 $\pm$ 0,1
FSH	1,9 $\pm$ 0,1
Valor de P	0,34
Efeito do nº de aplicações	
4 FSH	1,8 $\pm$ 0,2
6 FSH	1,9 $\pm$ 0,2
Valor de P	0,67

Figura 4 - Modelo Hipotético Gráfico final, demonstrando que não houve diferença entre os grupos controle e tratados com FSH no aumento do número de oócitos viáveis e embriões

Fonte: (SILVA, J. C. B., 2014)

8 DISCUSSÃO

População de Folículos Antrais (PFA)

Para compor os grupos de vacas, antes de iniciar o experimento, foi considerado a PFA. Foram observadas, em cada grupo, proporções semelhantes de vacas com baixo, médio e alto número de folículos antrais ao serem examinadas por ultrassonografia.

No presente estudo, a PFA foi analisada como covariável. No entanto, esse fato chamou a atenção pelos resultados obtidos.

O número oócitos totais, viáveis e CI, bem como número de oócitos enviados para a FIV, clivados e número de embriões D7 foram significativos.

Esses resultados são importantes do ponto de vista comercial, pois no momento da escolha de doadoras para programas de produção *in vitro* de embriões a PFA esta é uma característica a ser considerada no sentido de obter melhores resultados. Essa seleção poderia ser antecipada e utilizada até mesmo em bezerras analisando-se as concentrações plasmáticas do AMH, pois, segundo Batista et al. (2014), existe uma correlação entre a PFA e o número de folículos saudáveis e oócitos recuperados.

Variáveis foliculares

O uso do FSH não alterou o número de folículos, porém alterou a sua distribuição, considerando o diâmetro folicular. Resultados semelhantes foram observados por Vieira et al. (2014) quando vacas Holandesas receberam 200 mg FSH (Folltropin - Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) divididos em 4 aplicações, seguidos de um “coasting period” de 40 horas. Nesse estudo, as doadoras tratadas com FSH tinham menor proporção de folículos pequenos ($P < 0.001$) e alta proporção de folículos médios ($P < 0.001$) no momento da OPU. Dados descritos por Lonergan et al. (1993); Goodhand et al. (1999) e Goodhand et al. (2000) demonstram que ocorre o aumento do número de folículos de tamanhos médios e grandes após o tratamento com FSH administrado em 4 doses, associado ao “coasting

period” (33 a 48 h), claramente resultando em maior porcentagem de folículos entre 5 e 10 mm.

Esta resposta deve estar relacionada com o efeito do FSH, uma vez que a fase antral do desenvolvimento folicular é dependente das gonadotrofinas, que induzem o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos em ondas foliculares (FORTUNE et al., 2001). Ainda, estudos reportaram que o uso de FSH durante o período de divergência folicular pode acarretar superestimulação ovariana, ou seja, crescimento de diversos folículos em codominância (ADAMS et al., 1993; FORTUNE et al., 2001). Esta indução hormonal é normalmente realizada antes início da dominância, quando o folículo mede 8,5 mm de diâmetro em vacas *Bos taurus* (GINTHER et al., 1997), permitindo a recuperação de uma população homogênea de folículos (GINTHER et al., 2000; MERTON et al., 2003).

Houve uma tendência de maior número de folículos médios no grupo FSH4 em relação ao FSH6 ($P = 0,067$). Esse efeito pode estar relacionado à maior dosagem de FSH no início do tratamento no grupo FSH4, resultando um maior recrutamento de folículos da onda.

Corpo lúteo

É importante ressaltar que foi realizada a administração de PGF em todas as vacas deste estudo, visando à remoção de possíveis corpos lúteos. Segundo El-Sherry et al. (2010), vacas tratadas com PGF, nove ou dez dias após o cio, seguido de sincronização da emergência da onda folicular (baixa concentração de progesterona durante o tratamento com FSH) tiveram maior número de folículos, em comparação com vacas submetidas ao mesmo tratamento, em concentrações crescentes de progesterona, no início do ciclo estral. Além disso, a remoção do CL pode ser uma interessante estratégia para a liberação de espaço no parênquima ovariano para o crescimento de novos folículos. No entanto esta afirmativa é ainda bastante controversa. No presente estudo, cerca de 18% das vacas ainda possuíam CL no dia da OPU, apesar da administração de agente luteolítico. Em estudos sobre o efeito luteolítico após a administração de PGF, foi relatado que entre 60 a 70% dos animais tratados foram detectados em cio 4 dias após a aplicação de PG (TWAGIRAMUNGU et al., 1995).

No sentido de aumentar a eficiência da luteólise, Bridges et al. (2008) utilizaram, em sua metodologia, duas aplicações de PGF com intervalo de 12 h, pois deste modo é possível induzir a lise do CL com mais eficiência (95 - 100 %). Outro fato que poderia explicar a presença dos corpos lúteos no momento da OPU seria a possibilidade das vacas estarem no metaestro no momento da aplicação da PGF, pois, de acordo com Tsai e Wiltbank (1997), durante os estágios iniciais do ciclo, que são caracterizados por uma massiva

neovascularização, o CL foi refratário a uma única aplicação de PGF. Somente nos dias 5 ao 16 após o estro, a PGF exógena pode causar regressão do CL bovino.

A regressão luteal causada pela PGF apresenta primariamente sua ação através dos receptores específicos presentes na membrana plasmática das grandes células luteínicas (SAKAMOTO et al., 1995), onde o RNAm destes receptores de PGF foi altamente expresso e acumulado nas grandes células em estágios não específicos do ciclo estral (SAKAMOTO et al., 1994, 1995; TSAI; WILTBANK, 1998).

Durante o exame com o Doppler, realizado na segunda réplica, algumas imagens de corpo lúteo foram visualizadas, apresentando maior fluxo sanguíneo (escore de 3 a 4). Em alguns casos foi possível notar que havia a presença física do corpo lúteo, sem que o mesmo estivesse funcional.

Taxa de recuperação

A taxa de recuperação dos oócitos foi semelhante entre os grupos controle e tratados. Isso pode ser sugestivo de que o sistema de aspiração folicular, constituído pela bomba de vácuo e pela agulha utilizada (20G), tenha apresentado similar eficiência para a aspiração do conteúdo folicular, independentemente de seu diâmetro. Resultados diferentes foram observados por Seneda et al. (2001), que obtiveram maior taxa de recuperação de oócitos em folículos pequenos. Os autores acreditam que o menor volume do fluido folicular associado à menor pressão intra-folicular favorece a coleta e diminui as perdas dos oócitos durante o procedimento.

Lonergan et al. (1994) tiveram maiores taxas de recuperação de folículos <6mm comparado com folículos >6mm e Goodhand et al. (1999) observaram menores taxas de recuperação em novilhas tratadas com FSH, que tiveram maior número de folículos grandes, em comparação com novilhas não tratadas. Ainda, de acordo com Seneda et al. (2001), não está claro se o tamanho do folículo interfere na recuperação de oócitos em vacas.

Uma estratégia para melhorar a taxa de recuperação dos oócitos seria o aumento da pressão do vácuo. No entanto, pressões acima de 80 mmHg resultam em aumento significativo de COCs parcialmente ou totalmente desnudos (HASHIMOTO et al., 1999).

Variáveis oocitárias

O tratamento com FSH não alterou a quantidade, nem a qualidade dos oócitos recuperados.

Com relação ao CI, houve uma tendência de diminuição no grupo tratado com FSH. Sasson et al. (2003) e Grieshaber et al. (2003), utilizando microarranjo de RNAm, observaram que o FSH promove a expressão de um grande número de genes incluindo os envolvidos na reorganização de microtubulos e citoesqueleto de actina e tubulina, cadeia pesada da kinesina e tropomiosina.

Como o CI difere, morfologicamente, dos oócitos viáveis por não apresentar o citoplasma de aspecto homogêneo pode ser que essa reorganização contribua de forma positiva para no aproveitamento dos oócitos com citoplasma irregular.

PIVE

No presente estudo, a PIVE não foi alterada com a utilização do FSH.

Em estudo semelhante, realizado no Brasil, Vieira et al. (2014), encontraram diferença significativa ($P = 0,01$) na produção de embriões no D7. Utilizando 200 mg de FSH-p, divididos em 4 aplicações com doses decrescentes intervaladas de 12 h, em vacas holandesas não lactantes, o grupo tratado produziu $4,9 \pm 0,8$ embriões enquanto o controle produziu $2,7 \pm 0,6$ ($P = 0,01$). Já no presente estudo o grupo tratado produziu $4,3 \pm 0,46$ contra $4,1 \pm 0,5$ do grupo controle ($P = 0,79$). A taxa de produção de embriões no D7 também apresentou diferença significativa no estudo de Vieira et al. (2014), ($P < 0,001$). O grupo tratado com FSH-p apresentou taxa de produção de embriões de 52,8% contra 31,3% no grupo controle, enquanto que nossos resultados foram de 26,4% no grupo tratado versus 23,5% no grupo controle ($P = 0,43$). Deve-se destacar que os animais envolvidos no presente estudo foram selecionados em uma população de doadoras destinada à produção comercial de embriões.

Além da dosagem de FSH e forma de aplicação é interessante considerar o intervalo entre a última aplicação de FSH e o início da OPU, que no nosso caso foi de 36 horas. Analisando os dados publicados por Blondin et al. (2002), o “coasting period” de 48 h apresentou melhores resultados na distribuição de folículos pois, mais folículos entre 5 e 10 mm estavam presentes nos ovários, com esse tratamento ($P = 0,003$). A maior produção de embriões, no entanto, ocorreu quando o “coasting period” foi de 33 h, precedido da aplicação de LH 6 h antes da OPU ($P = 0,03$). O efeito do LH pode ser explicado pela participação

dessa gonadotrofina no processo final de maturação oocitária e folicular. Chaubal et al. (2006) observaram melhora nas taxas de produção embrionária após utilização de 1500 UI de hCG (im) 6 horas antes a OPU após um “coasting period” de 48 horas.

Em situações *in vivo*, as condições do folículo antral desempenham um importante papel na determinação da qualidade do oócito, pois durante o crescimento folicular, genes maternos são transcritos e traduzidos em moléculas de proteínas que são acumuladas no oócito. Esse processo é crucial para garantir a sobrevivência do embrião jovem antes da ativação do genoma embrionário (VASSENA et al., 2003).

Como a ativação do genoma embrionário ocorre nesse período, quando o embrião começa a utilizar o seu próprio DNA para produzir os fatores de transcrição, a taxa de clivagem, uma das variáveis analisadas, é uma informação subjetiva para avaliar a eficiência do processo, pois, segundo Britt (1992), existe um potencial “carry-over” das condições adversas durante o crescimento do oócito e sua maturação na fertilização.

Hemodinâmica ovariana

A avaliação da Hemodinâmica é uma nova ferramenta para investigar o ambiente ovariano e foi utilizada no presente estudo durante a segunda réplica do experimento. Segundo Rauch et al. (2008) o Modo Collor Doppler foi superior ao Modo-B em diferenciar cistos foliculares de cistos luteinizados, avaliando o fluxo sanguíneo nos folículos, auxiliando na seleção do tratamento. Verificou-se que as mudanças estavam ligadas à dinâmica folicular, crescimento e atresia. O fluxo sanguíneo detectado na teca externa de folículos maduros aumenta com a proximidade do pico de LH e é mais ativo antes da ovulação. Foi observado também que o suprimento sanguíneo para o folículo que está sendo luteinizado aumenta proporcionalmente ao seu volume e à concentração plasmática de progesterona. O fluxo sanguíneo em torno do CL decresce rapidamente em resposta à PG ou seus análogos.

Modelo Hipotético Gráfico Final

O modelo hipotético gráfico final demonstra que houve maior número de folículos médios nos grupos tratados com FSH, em relação ao controle, independentemente do número de aplicações. Não houve diferença no número de oócitos viáveis nem de embriões, mas uma ligeira diminuição no número de oócitos com citoplasma irregular.

9 CONCLUSÕES

A hipótese do presente estudo não foi confirmada, pois a utilização de FSH (200 mg), dividida em seis e quatro aplicações consecutivas, em vacas não lactantes, com emergência da onda folicular sincronizada, aumentou o número de folículos médios (6 a 10 mm) presentes nos ovários no dia da OPU, em relação ao controle, porém não aumentou o número de oócitos recuperados por OPU nem o número de embriões viáveis, produzidos *in vitro*. Considerando-se os animais que receberam quatro e seis aplicações de FSH, não houve diferença no número de folículos, número de oócitos recuperados e embriões produzidos, em relação aos tratamentos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267–275, 1993.

ADAMS, G. P.; MATTIERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 94, p. 177–188, 1992.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2369–2376, 1999. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75487-1

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303–1322, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327686>>. Acesso em: 14 mar. 2014

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2219–2226, 1999.

BAGG, M. A.; NOTTLE, M. B.; ARMSTRONG, D. T.; GRUPEN, C. G. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 19, p. 797–803, 2007.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M., BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583–1593, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.006

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M., BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, v. 47, n. 4, p. 134–141, 2012. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x

BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448–452, 2014. doi:10.1111/rda.12304

BAVISTER, B. D.; SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. **Human Reproduction**, v. 15, p. 189–198, 2000.

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, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751261>>. Acesso em: 2 abr. 2014.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061–1075, 1997.

BLONDIN, P.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 803–813, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728173>>. Acesso em: 2 abr. 2014

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A. L.; SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far ? *Animal Reproduction*, v. 9, n. 450, p. 281–289, 2012.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 906–14, 2004. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.016

BOLS, P. E. J.; VANDENHEEDE, J. M. M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Transvaginal Ovum Pick-Up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, n. 94, p. 677–687, 1995. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>>. Acesso em: 6 dez. 2013.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. M. Follicular Dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, n. 97, p. 277–289, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 59–70, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729062>>. Acesso em: 23 ago. 2013.

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

BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2alpha from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843–851, 2008. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.011

BRISON, D. R.; HOUGHTON, F. D.; FALCONER, D.; ROBERTS, S. A.; HAWKHEAD, J.; HUMPHERSON, P. G.; LIEBERMAN, B. A.; LEESE, H. J. Identification of viable embryos

in IVF by non-invasive measurement of amino acid over. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2319–2324, 2004.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 217, 1987.

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. 01, p. 1341–1357, 2001.

CHAUBAL, S. A.; FERRE, L. B.; MOLINA, J. A.; FABER, D. C.; BOLS, P. E. J.; REZAMAND, P.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 719–728, 2007. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.022

CHAUBAL, S. A.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, C. L.; FERRE, L. B.; FABER, D. C.; BOLS, P. E. J.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1631–1648, 2006. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.07.020

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 1–2, 2010. doi:10.1095/biolreprod.110.084269

DURLINGER, A. L. L.; VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. N. Review Regulation of ovarian function : the role of anti-Müllerian hormone. **Reproduction and Fertility**, v. 124, n. 5, p. 601–609, 2002.

DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. **Theriogenology**, v. 65, n.1, p.102–15, 2006. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.009

EL-SHERRY, T. M.; MATSUI, M.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A.; MEGAHED, G. A.; SHEHATA, S. H.; MIYAKE, Y. I. Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 488–95, 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.031

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437–442, 1995.

FANCHIN, R.; SCHONAUER, L. M.; RIGHINI, C.; GUIBOURDENCHE, J.; FRYDDMAN, R.; TAIEB, J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. **Human Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 323–327, 2003. doi:10.1093/humrep/deg042

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 9, p. 2695–703, 1994. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648–654, 2001.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109–126, 2004. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.031

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599–616, 2003. doi:10.1016/S0093-691X(02)01243-8

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 96, p. 371–379, 1996.

GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 886–95, 2008. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.01.006

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 128, n. 4, p. 417–22, 2004. doi:10.1530/rep.1.00259

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 4, p. 920–927, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727261>>. Acesso em: 12 out. 2013.

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

GINTHER, O.; KOT, K.; KULICK, L.; WILTBANK, M. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75–87, 1997. Retrieved from Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X97001921>>. Acesso em: 12 out. 2013.

GOODHAND, K.; STAINES, M.; HUTCHINSON, J. S.; BROADBENT, P. 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, 2000. doi:10.1016/S0378-4320(00)00186-X

GOODHAND, K.; WATT, R.; STAINES, M. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951–961, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99000412>>. Acesso em: 12 out. 2013.

GRIESHABER, N. A.; KO, C.; GRIESHABER, S. S.; JI, I.; JI, T. H. Follicle-stimulating hormone-responsive cytoskeletal genes in rat granulosa cells: class I beta-tubulin,

tropomyosin-4, and kinesin heavy chain. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 29–39, 2003. doi:10.1210/en.2002-220477

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

HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA LOPES, F. F. AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; CHASE JR, C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91–103, 2001.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 51, 757–765, 1999. doi:10.1016/S0093-691X(99)00115-6

HENDRIKSEN, P. J.; STEENWEG, W. N.; HARKEMA, J.; MERTON, J.; BEVERS, M. ; VOS, P. L. A.; DIELEMAN, S. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 909–920, 2004. doi:10.1016/S0093-691X(03)00278-4

HENNEBOLD, J. O. N. D.; TANAKA, M.; SAITO, J.; HANSON, B. R.; ADASHI, E. L. I. Y. Ovary-Selective Genes I: The generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2725–2734, 2000.

HERZOG, K.; VOSS, C.; KASTELIC, J. P.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, 549–54, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.024

HIRINCHS, K.; KENNEY, D. F.; KENNEY, R. M. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in de mare. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 107–112, 1990.

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 707–724, 1994.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23–32, 1997.

IRELAND, J. J. A.; SMITH, G. W. B.; SCHEETZ, D. A.; FOLGER, J. K. A. Does size matter in females ? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility , utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, p. 1–14, 2011.

KAJIHARA Y.; BLAKEWOOD E.G.; MYERS M.W.; KOMETANI, N.; GOTO K.; GODKE R.A. *In vitro* Maturation and Fertilization of Follicular Oocytes Obtained from Calves. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, 1991.

LAMBERT R.D.; SIRARD M.A.; BERNARD C.; BÈLAND R.; RIOUX J.E.; LECLERC P.; M. D. P. A. B. M. *In vitro* Fertilization of Bovine Oocytes Matured In Vivo and Collected at Laparoscopy. **Theriogenology**, 25, n. 1, p. 117-133, 1986.

LEE, K. S.; JOO, B. S.; NA, Y. J.; YOON, M. S.; CHOI, O. H.; KIM, W. W. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. **Journal Assisted Reproduction Genetics**, v. 18, p. 490–498, 2001.

LENZ, S.; LEETON, J.; RENOU, P. Transvaginal recovery of oocytes for *in vitro* fertilization using vaginal ultrasound. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v. 4, n. 1, p. 51–55, 1987.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; MERMILOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 841–59, 2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.015

LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00961.x

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected *in vitro* or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, p. 297–305, 2003.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BAGUSI, A.; BOLAND, M.; GORDON, I. Effect of p-FSH administration prior to slaughter on follicle size distribution and *in vitro* development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 260, 1993.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; 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, p. 48–53, 1994.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L.; GENETICS, T. O. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, p. 67–72, 1994.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; HORKY, F.; KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, , p. 543–550, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00003691>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 329–335, 2004. doi:10.1016/S0093-691X(03)00216-4

MAPLETOFT, R. J. History and perspective on bovine embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 168–173, 2013.

MARCHAL, R.; VIGNERON, C.; PERREAU, C.; MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1523–1532, 2002.

MCEVOY, T.; ROBINSON, J.; ASHWORTH, C. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**, v. 55, p. 113–129, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004507>>. Acesso em: 28 maio 2013.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651–674, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499010>>. Acesso em: 28 maio 2013.

MONNIAUX, D.; BARIL, G.; LAINE, A. L.; JARRIER, P.; POULIN, N.; COGNIÉ, J.; FABRE, S. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 142, n. 6, p. 845–854, 2011. doi:10.1530/REP-11-0211

NIVET, A. L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction Research**, v. 143, n.2, p. 165–71, 2012. doi:10.1530/REP-11-0391

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

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

PIETERSE, M. C.; WURTH, Y. A. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n.1, p. 19–24, 1991.

RAUCH, A.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Colour Doppler Sonography of Cystic Ovarian Follicles in Cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 6, p. 447–453, 2008. doi:10.1262/jrd.20025

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONToux, M.; MONNIAUX, D. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 1, 50–59, 2009. doi:10.1095/biolreprod.108.072157

RICO, C.; MÉDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONToux, M.; CLÉMENT, F.; MONNIAUX, D. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale

study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 3, p. 560–571, 2011. doi:10.1095/biolreprod.110.088187

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F. O'FARRELL, K. J.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939–949, 2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.008

TAN, S. J.; LU, K. H. Effects of different oestrus stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 335, 1990.

SAKAMOTO, K.; EZASHI, T.; MIWA, K.; OKUDA-ASHITAKA, E.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T.; HAUASHI, O. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin f 2 alpha receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 5, p. 3881–3886, 1994.

SAKAMOTO, K.; MIWA, K.; EZASHI, T.; OKUDA-ASHITAKA, E.; OKUDA, K.; HOUTANI, T.; HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandin F2 alpha receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 99–105, 1995.

SASSON, R.; DANTES, A.; TAJIMA, K.; AMSTERDAM, A. Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. **FASEB Journal** : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 17, n. 10, p. 1256–1266, 2003. doi:10.1096/fj.02-0740com

SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K. G.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1-2, p. 208–214, 2008. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.007

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A. de.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37–43, 2001. doi:10.1016/S0378-4320(01)00113-0

SHAHAM-ALBALANCY, A.; ROSENBERG, M.; FOLMAN, Y.; GRABER, Y.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2771–2778, 2000. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75173-3

SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local Effect of the Conceptus on Uterine Vascular Perfusion During Early Pregnancy in Heifers. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 139, n. 2, p. 453–463, 2010. doi:10.1530/REP-09-0363

SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6461–6472, 2013. doi:10.3168/jds.2013-6814

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020

SNIJDERS, S. E.; DILLON, P.; O'FARRELL, K.; DISKIN, M.; WYLIE, A. R.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 17–31, 2001. doi:10.1016/S0378-4320(00)00217-7

SNIJDERS, S. E.; DILLON, P.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 981-989, 2000.

TANEJA, M.; BOLLS, P. E. J.; VELDE, A. VAN. DE.; JU, J. C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo* : influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 206–213, 2000.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. **In Embryo Transfer Newsletter**, v. 22, p. 12-19, 2004.

TSAL, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ induces expression of prostaglandin g / h synthase-2 in the ovine corpus luteum : a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1016–1022, 1997.

TSAL, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ alpha Regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 346–352, 1998.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J.; ANIMALES, S. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle : a review . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3141–3151, 1995.

VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 2, p. 105–119 105, 2006.

VAN HOECK, V.; BOLLS, P. E. J.; BINELLI, M.; LEROY, J. L. M. R. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1-2, p. 19-29, 2014. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.07.015

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, 2003. doi:10.1016/S0093-691X(03)00101-8.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 1–4, 2005.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; MOREIRA, R. J. C.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 318–324, 2014.
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.04.013.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. 1–3, 2007.
doi:10.2527/jas.2006-432

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17–29, 2006.
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.003

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, 2003. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527088>

ZIMMERMANN, R. C.; HARTMAN, T.; KAVIC, S.; PAULI, S. A.; BOHLEN, P.; SAUER, M. V.; KITAJEWSKI, J. Vascular endothelial growth factor receptor 2 – mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 5, p. 659–669, 2003.
doi:10.1172/JCI200318740.Introduction