

PAPER 1:

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ALTERNATIVAS DE PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

(Revisão formatada de acordo com a Revista Brasileira de Reprodução Animal)

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ALTERNATIVAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES BOVINOS¹
(PHYSIOLOGICAL ASPECTS AND ALTERNATIVES FOR BOVINE *IN*
VITRO EMBRYO PRODUCTION)**

Luiz Francisco Machado **Pfeifer**¹ e Marcio Nunes **Corrêa**²

¹ Médico Veterinário, M.C. em Reprodução Animal

² Dr., M.C., Prof. Adjunto

^{1,2} Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Veterinária – Departamento de Clínicas Veterinária

NUPEEC – Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

www.ufpel.tche.br/nupeec

Campus Universitário – 96010 900 - Pelotas/RS

E-mail: lpfeifer@ufpel.edu.br - Tel: (53) 275 7506 – 9103 6384

RESUMO

A produção de embriões *in vitro* (PIV) representa uma alternativa para aumentar o aproveitamento de gametas de animais de alto mérito zootécnico. Apesar dos avanços obtidos na PIV nos últimos anos, a produção de embriões transferíveis ainda é baixa. O objetivo desta revisão é discutir alternativas para produção de embriões *in vitro*, bem como mecanismos de formação e maturação dos ovócitos que podem estar relacionados com a eficácia dos resultados obtidos. Alguns estudos demonstram a influência dos fatores de crescimento folicular, das gonadotrofinas, dos hormônios esteróides e de outros hormônios sobre o desenvolvimento folicular e qualidade dos complexo cúmulus-ovócito (CCOs). A fase folicular de crescimento lento é crítica para o desenvolvimento da capacidade do ovócito atingindo o tamanho e a competência final. Ainda são insuficientes as informações sobre as influências endócrinas ou igualmente da dependência do crescimento de pequenos folículos antrais quando ocorre comprometimento na função folicular ou ovocitária. Um número variado de diferentes técnicas e protocolos para o tratamento de doadoras de ovócitos têm sido descritos a fim

de melhorar o rendimento, as taxas de recuperação de CCOs e o desenvolvimento da competência dos ovócitos coletados *in vivo*. A partir das considerações apresentadas nesta revisão é possível verificar a importância de um maior entendimento dos fatores que estão envolvidos no processo de PIV, a fim de permitir o estudo de novas alternativas que incrementem os resultados obtidos em programas de reprodução assistida.

PALAVRAS-CHAVE: Produção de embriões *in vitro*, ovócitos e bovinos.

SUMMARY

The embryo production *in vitro* (PIV) represents a way to increase the gamete profit from animals with high zootechnic level. In spite of the advances obtained in the PIV in the last few years, the production of transferable embryos still is low. The aim of this review is to discuss ways to product embryos *in vitro*, as well as ways of formation and maturation of oocytes that can be related with the effectiveness of the results obtained. Some studies show that the influence of the follicular growth factors, of the gonadotrophines, of the steroides and the hormones on the follicular development and the quality of the complex oocytes-cumulus (COCs). The follicular phase of slow growth is critic for the development capacity of the oocytes reaching the final competence and length. The information about the endocrine influences still aren't sufficient or the dependence of growth of small antral follicles when occur a loss in the ovacitary or follicle function. A variable number of different technics and protocols for the treatment of oocytes donors are being described with the aim of improving the results, the recovering rate of COCs and the competence development the oocytes collected *in vitro*. From these considerations presented in this review it's possible to verify the importance of a bigger understanding of the factors that are involved in the PIV process, with the aim of allowing new alternatives that increase the results obtained in programs of assisted reproduction.

KEY-WORDS: *In vitro* embryo production, oocytes and bovine.

INTRODUÇÃO

O crescente aumento na demanda por embriões bovinos tanto comercialmente, quanto para pesquisa fez com que houvesse um incremento considerável do uso de biotécnicas reprodutivas como a PIV (produção de embriões *in vitro*).

Neste contexto a PIV trata-se de uma opção para acelerar os avanços na reprodução e genética de bovinos (Pivato, 2001). Algumas aplicações da tecnologia de PIV incluem avanços no melhoramento animal, na produção de um número maior de embriões para transferência comercial, para superar problemas de infertilidade em vacas de alto valor, na produção de animais transgênicos, além de permitir a sexagem de embriões (Brackett, 1992; Brackett & Zuelke, 1993).

Apesar do progresso obtido na PIV nos últimos anos, a produção de embriões transferíveis ainda é reduzida (Pivato, 2001). Muitos destes resultados têm sido atribuídos às condições de maturação e fertilização *in vitro*. No entanto, estes índices insatisfatórios podem estar relacionados ao desenvolvimento da competência de ovócitos coletados de pequenos folículos (2 – 6 mm de diâmetro) (Blondin & Sirard, 1995).

No intuito de melhorar a eficiência da PIV, vários trabalhos estão sendo desenvolvidos com tratamentos hormonais nas doadoras visando a sincronização da emergência da onda folicular, maior quantidade de folículos e, conseqüentemente, de ovócitos, obtenção de ovócitos de melhor qualidade e maiores taxas de recuperação (Gong *et al.*, 1991; Looney *et al.*, 1994; Greve *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 1997; Goodhand *et al.*, 1999).

O objetivo desta revisão é discutir alternativas para produção de embriões *in vitro*, bem como mecanismos de formação e maturação dos ovócitos que podem estar

relacionados com a eficácia dos resultados obtidos em programas de reprodução assistida.

1. Aspectos fisiológicos e fatores que podem afetar a qualidade ovocitária

O estudo da foliculogênese e de fatores de crescimento folicular é indispensável para que se torne possível desenvolver alternativas que aumentem a eficiência de técnicas como a sincronização de cio, transferência de embriões e a PIV. Alguns estudos demonstram a influência dos fatores de crescimento folicular, das gonadotrofinas e dos hormônios esteróides sobre o desenvolvimento folicular e qualidade dos CCOs (complexo cúmulus-ovócitos) (Fair, 2003; Mihm & Bleach, 2003; Sartori *et al.*, 2004).

O crescimento de folículos antrais em bovinos, assim como, em outras espécies, apresenta dois estágios de crescimento. Uma fase de crescimento lento, que dura em torno de 30 dias, se estendendo desde a formação do antro, com diâmetro de 300 µm, até cerca de 3 a 5 mm (Lussier *et al.*, 1987). Esta fase é crítica para o desenvolvimento da capacidade do ovócito, na qual atinge o tamanho e a competência final (Fair *et al.*, 1995; 1997). A segunda fase, rápida, ocorre em apenas 5 a 7 dias e vai desde a detecção do antro folicular por ultra-som, com 3 mm, até a possível ovulação deste folículo (Sunderland *et al.*, 1994).

Ainda são insuficientes as informações sobre as influências endócrinas ou igualmente da dependência do crescimento de pequenos folículos antrais quando ocorre comprometimento na função folicular ou ovocitária (Cushman *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001). Experimentos conduzidos em vacas nos quais a liberação das gonadotrofinas reguladas pelo GnRH hipotalâmico foi abolida (Gong *et al.*, 1995; 1996; Crowe *et al.*, 2001) demonstraram que a primeira fase de crescimento folicular antral pode ocorrer em um ambiente caracterizado por níveis basais de FSH e sem pulsos de LH. Ainda não

está claro como o crescimento de pequenos folículos antrais é possível sem influência do FSH. A parede folicular neste estágio não possui habilidade de resposta ao FSH, sendo que os folículos não demonstram progressão de estágios pré-antrais até o desenvolvimento de pequenos folículos antrais (Abel *et al.*, 2000). No entanto, a onda folicular durante a segunda fase de crescimento folicular antral é absolutamente dependente da elevação das concentrações de FSH e adequados pulsos de LH (Mihm, 2003).

1.1. Ovogênese

O desenvolvimento de folículos e ovócitos nos mamíferos começa durante a vida fetal. Em síntese, as células germinativas primordiais se multiplicam por mitose até que as ovogônias formadas se transformam em ovócitos primários. A progressão dos ovócitos para a primeira prófase meiótica inicia, em bovinos, entre os dias 75 e 80 após a concepção (Erickson, 1966). A prófase meiótica é composta por vários estágios: proleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno (estágio em que a meiose é interrompida). Em bovinos, o diplóteno é atingido em média aos 170 dias pós-concepção (Baker & Hunter, 1978). Cada estágio apresenta uma determinada característica no cromossomo (Baker & Franchi, 1967). Os cromossomos, durante a interrupção da meiose se descondensam e uma estrutura nuclear conhecida como vesícula germinativa (VG) é formada. A interrupção da meiose persiste até o momento da puberdade, quando um ou mais ovócitos começa a divisão reducional novamente, a VG nestes ovócitos desaparece, a cromatina é recondensada, os pares de cromossomos homólogos são separados e a metade destes é expulsa pela formação do primeiro corpúsculo polar. Neste ponto a meiose é novamente interrompida (na metáfase II). Estes eventos, iniciado pela quebra da VG e completados pela formação do primeiro

corpúsculo polar, conduzem à produção de um ovócito maduro e fertilizável (Dekel *et al.*, 1989; Homa, 1995; Fissore, 1996).

O hormônio responsável pela retomada da divisão meiótica *in vivo* é o LH (hormônio luteinizante). Estudos têm demonstrado que a maturação ovocitária, em bovinos, está intimamente relacionada com o momento do pico pré-ovulatório de LH (Wise *et al.*, 1994) e que ovócitos de pequenos folículos (< 8 mm) não retomam a meiose devido à necessidade de receptores para o LH nas células da granulosa (Xu *et al.*, 1995; Bevers *et al.*, 1997).

Os ovócitos inclusos nos folículos primordiais formam um estoque finito, os quais só saem deste estágio quando forem estimulados (Erickson, 1966). Apesar de que registros relatados por Johnson *et al.* (2004) indicam que ratas juvenis e adultas possuem atividade mitótica nas células germinativas necessária para manter o pool de folículos. Os fatores que regulam este crescimento ainda não são bem conhecidos.

1.2. Fatores envolvidos na ativação de folículos pré-antrais e crescimento de folículos antrais

A ativação de folículos primordiais é caracterizada pela transformação, da forma plana para cubóide, bem como pela multiplicação, das células da granulosa que circundam o ovócito. Os fatores que estimulam a multiplicação das células da granulosa são considerados como promotores da ativação de folículos primordiais (Fair *et al.*, 1997; Braw-tal & Yossefi, 1997).

Um número variado de fatores está envolvido no crescimento de folículos pré-antrais. Lee *et al.* (1999) sugeriram que a BMP-7 (*bone morphogenetic protein-7*) faz a estimulação de folículos primordiais via promoção da divisão das células da granulosa, assim como o IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) (Monniaux & Pisselet, 1992) e o EGF

(*epidermal growth factor-like*) (Hsu *et al.*, 1987). Outros fatores estão envolvidos no controle da ativação do folículo primordial, como o AMH (*anti-mullerian inhibiting hormone*) (Durlinger *et al.*, 2002). Vários outros fatores de crescimento estão sendo associados ao crescimento folicular pré-antral, incluindo *kit ligand* (Parrott e Skinner, 1997), bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) (Nilsson *et al.*, 2001), LIF (*leukemia inhibitory factor*) (Nilsson *et al.*, 2002) e BMP-15 (*bone morphogenetic protein-15*) (Otsuka *et al.*, 2000).

Recentemente, têm sido proposto que o ovócito se desenvolve desde os estágios de folículos primários (Eppig, 2001). Esta afirmação está centrada na ação do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9). O GDF-9 está aparentemente relacionado aos fatores ovarianos de regulação BMP, o qual é mediado através do BMP-2 receptor (BMPR-II) (Vitt *et al.*, 2002). A expressão do RNAm do GDF-9 têm sido detectada nos folículos primários de camundongos, ratos e humanos (McGrath *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1999; Jaatinen *et al.*, 1999; Aaltonen *et al.*, 1999) e nos estágios primários e subsequentes estágios em bovinos e ovinos (Bodensteiner *et al.*, 1999). Estas afirmações sugerem que a ação primária do GDF-9 é promover a progressão dos folículos primários até os estágios antrais, desta maneira estimulando indiretamente a população primordial a aumentar a transição dos folículos primordiais para os estágios primários (Vitt *et al.*, 2000; Nilsson & Skinner, 2002). Camundongas inférteis com deficiência de GDF-9 cessam o desenvolvimento folicular no estágio de folículos primários. Embora os ovócitos de camundongas com redução dos níveis de GDF-9 cresçam de forma acelerada, as células somáticas não conseguem se desenvolver além do estágio de folículo primário (Dong *et al.*, 1996). Este bloqueio coincide com o início da expressão do GDF-9 e BMP-15, ambos detectados em ovócitos de folículos primários até os estágios foliculares ovulatórios. O GDF-9 pode ainda ter ação de

promover a progressão dos folículos pela estimulação da expressão de *kit ligand* pelas células da granulosa. No entanto, a regulação entre GDF-9 e *kit ligand* parece ser altamente complexa. Elvin *et al.* (1999) registraram um aumento na expressão do gene *Kitl* nos folículos sem GDF de camundongas. Porém, Eppig (2001) sugere que este fator, produzido pelas células da granulosa, promove o crescimento do ovócito até que o diâmetro espécie-específico seja atingido, ao ponto em que o GDF-9 seja secretado pelo ovócito suprimindo a expressão de *Kit ligand* nas células do cúmulus, deste modo reduzindo a taxa de crescimento ou terminando o crescimento ovocitário (Fair, 2003).

O crescimento dos folículos antrais, diferentemente dos folículos pré-antrais, são totalmente dependentes das gonadotrofinas. O ciclo estral bovino apresenta duas ou três ondas foliculares, sendo que cada uma é precedida de um aumento das concentrações dos níveis de FSH (Adams *et al.*, 1992). Este aumento dos níveis de FSH inicia o crescimento de um grupo de folículos FSH-dependentes de diâmetro ≥ 3 mm (milímetros). A primeira onda começa no dia 1 (D1) do ciclo estral, sendo que o dia 0 (D0) é considerado o dia do cio. Durante os três dias seguintes, os folículos que tinham um diâmetro de ≥ 3 mm continuam crescendo até que a população folicular no ovário esteja com 4–8 mm de diâmetro no D3 (Ginther *et al.*, 1996; Hagemann *et al.*, 1999). Neste momento um dos folículos com maior diâmetro começa a crescer mais rápido e torna-se o futuro folículo dominante (FD), sendo que os outros sofrerão atresia (Ginther *et al.*, 1996). Isto deve-se ao efeito inibitório direto que o FD exerce sobre o desenvolvimento de folículos subordinados em vacas e ovelhas (Campbell *et al.*, 1991, O'Shea *et al.*, 1994, Law *et al.*, 1992, Wood *et al.*, 1993) causando sua atresia (Wolfsdorf *et al.*, 1997). Os fatores envolvidos na seleção do FD são mais complexos e envolvem fatores de crescimento folicular, bem como quantidade de receptores para LH na granulosa entre outros fatores. Porém, por não se tratar do objetivo principal desta

revisão estes aspectos não serão abordados. No D6, o FD atinge seu diâmetro máximo e se mantém funcional por 2 a 4 dias (fase de dominância). Quando o FD perde sua funcionalidade (fase de regressão), uma nova onda emerge. Com a regressão luteal, o FD da segunda ou terceira onda folicular se mantém funcional sendo acompanhado pelo aumento dos pulsos de LH, até que ocorra o pico de LH fazendo a maturação folicular e ovocitária final, ocasionando a ovulação do FD (Hsueh *et al.*, 1994).

O LH possui uma característica de fazer mudanças na estrutura do folículo e ovócito sendo o principal responsável pelo crescimento folicular final no período pré-ovulatório. O mecanismo que aparentemente está associado com divergência folicular é a indução de receptores de LH na granulosa, um incremento no estradiol circulante e uma diminuição plasmática de FSH (Sartori, 2004). Ou seja, o momento em que há maior divergência folicular é o momento em que os pulsos de LH começam a aumentar.

1.3. Efeito da dominância folicular na competência ovocitária

Com o crescimento de ovócitos inclusos nos folículos, alguns fatores influenciam a qualidade e desenvolvimento de sua competência. Estes fatores incluem diâmetro folicular, dia do ciclo estral, níveis de atresia e influência de outros folículos como o FD (Hagemann, 1999). Uma maior taxa de produção de blastocistos é observada quando os ovócitos são coletados durante a fase de crescimento folicular que àqueles coletados durante a fase de dominância folicular (Hagemann, 1999).

O FD exerce um efeito inibitório no desenvolvimento dos folículos subordinados causando sua atresia, principalmente através da secreção de inibina e estradiol 17- β (Matton *et al.*, 1981; Wolfsdorf *et al.*, 1997). Em trabalho realizado por Hagemann *et al.* (1999a) foi registrado o efeito supressivo do FD sob o diâmetro e competência dos ovócitos dos folículos subordinados. Neste estudo o desenvolvimento da competência *in vitro* dos ovócitos coletados durante a fase de crescimento de folículos de 3 a 5 mm, de

6 a 8 mm, de 9 a 12 mm e de 13 mm foi de 44%, 47%, 55% e 70%, respectivamente, sendo maior quando comparado àqueles recuperados durante a fase de dominância (31%, 27%, 30% e 44%, respectivamente).

Alguns trabalhos demonstram a influência do FD na foliculogênese. Bungartz & Niemann (1994) e Lussier *et al.* (1995) avaliaram, em programas de transferência de embriões, a remoção do FD no momento da superestimulação, comparando com aqueles tratamentos iniciados na presença de um FD. Nestes estudos observaram-se um maior número de ovulações e embriões viáveis.

Folículos dissecados durante a fase de dominância foram mais atrésicos que àqueles dissecados durante a fase de crescimento folicular. Registros de estudos realizados em ovelhas e em vacas indicam que uma moderada atresia não afeta negativamente a competência ovocitária que pode ser melhorada por um baixo nível de atresia (Matton *et al.*, 1981; Campbel *et al.*, 1991). Isto pode ser explicado pelas mudanças estruturais que são observadas em associação com a degeneração dos ovócitos que ocorre nos folículos subordinados (Blondin *et al.*, 1997), sendo similar àquela ocorrida nos folículos pré-ovulatórios próximo do momento do pico de LH (Assey *et al.*, 1994). Esta condição pode conferir alguma vantagem quando a atresia for recente (Fair, 2003). Para melhor avaliar estas afirmações são necessários mais estudos comparando a qualidade dos CCOs que tiveram seu desenvolvimento em diferentes níveis de atresia folicular e qual via de atresia folicular influencia a competência ovocitária, seja esta, através do aumento dos níveis de estradiol ou mesmo reduzindo os pulsos de LH através do uso exógeno de progesterona.

1.4. Liberação pulsátil de LH e os pequenos folículos antrais

O LH é responsável por uma série de eventos fisiológicos reprodutivos, alguns já citados anteriormente. A estimulação das células da teca pelo LH é essencial para

androgênese atuando como precursor para o estradiol, sendo que seu incremento é associado com a viabilidade dos pequenos folículos antrais e a continuação do progresso durante o crescimento da onda folicular (Austin *et al.*, 2001). Quando os folículos antrais emergem e são mantidos por uma fonte exógena de FSH, a atresia dos folículos subordinados é prevenida, não havendo seleção do FD. Os pequenos folículos antrais não sofrem atresia demonstrando uma redução dos receptores de LH na teca e dos níveis de RNAm das enzimas esteroidogênicas quando comparado ao FD (Mihm *et al.*, 1997, 2000). Quando são administradas doses de LH, concomitantemente ao FSH exógeno, e o potencial esteroidogênico do FSH mantido, os folículos antrais atingem níveis esteroidogênicos semelhantes aos dos FD (Crowe *et al.*, 2000). Ou seja, o LH é essencial para que ocorra a seleção do FD e para o desenvolvimento dos pequenos folículos antrais. De fato, a presença de receptores de LH nas células da granulosa ocorre na diferenciação do futuro FD dos demais folículos antrais. Porém, a fase de crescimento folicular FSH-dependente, antes da seleção do FD, não depende do LH. A função dos pequenos folículos antrais é sutilmente afetada em relação ao estradiol, inibina, IGF-I livre e moléculas de baixo peso molecular, proteínas de ligação do IGF, intrafoliculares, quando os pulsos de LH são reduzidos ou completamente abolidos usando tratamentos com esteróides (Ginther *et al.*, 2001; Austin *et al.*, 2002). Portanto, o LH é essencial para estimular folículos antrais acima de 9 mm de diâmetro (Gong *et al.*, 1996) quando há a troca de FSH- para LH-dependência.

1.5. Desenvolvimento da competência ovocitária em relação ao padrão folicular

Uma das formas de avaliar a competência dos ovócitos é através do diâmetro folicular (Wit, 2000; Vassena *et al.*, 2003; Lequarre, 2004). No entanto, folículos com diâmetros similares podem estar em diferentes fases fisiológicas (Vassena *et al.*, 2003),

evidenciando que não há uma boa correlação deste método de avaliação sobre os índices de PIV.

Lequarre *et al.* (2004), trabalhando com ovários de abatedouro, avaliaram o desenvolvimento da competência ovocitária a partir de ovócitos coletados de folículos antrais isolados de diferentes diâmetros. Os folículos foram separados, de acordo com seu diâmetro, em três grupos: folículos pequenos, menores que 4 mm; folículos médios, entre 4 e 5 mm de diâmetro; folículos grandes, com mais de 6 mm de diâmetro. Neste experimento foi obtido uma maior taxa de blastocistos a partir de folículos maiores que 6 mm do que dos folículos menores que 4 mm.

Em um outro estudo, Wit *et al.* (2000) estudaram o efeito do ambiente folicular na qualidade e desenvolvimento da competência dos CCOs de ovários obtidos de abatedouro. Os CCOs foram coletados de folículos não-atréticos, pouco atréticos, atréticos e muito atréticos sendo classificados de acordo com sua qualidade em A, B e C. Os CCOs de qualidade A foram obtidos principalmente, mas não exclusivamente, de folículos não atréticos. Os de qualidade B, foram obtidos de todas as classes de folículos atréticos e os de qualidade C, foram oriundos exclusivamente de folículos que apresentavam muita atresia. Os CCOs B, produziram mais blastocistos que os CCOs A e C, indicando que um pequeno nível de atresia pode apresentar resultados satisfatórios na PIV.

Um estudo realizado por Vassena *et al.* (2003) teve por objetivo investigar o quanto da morfologia e do desenvolvimento da competência ovocitária são relacionados com a fase de desenvolvimento folicular e a presença do CL ou do FD, a partir de CCOs coletados de ovários de vacas abatidas. Os animais foram submetidos à uma sincronização de ovulação e foram abatidos nos dias 2, 3, 5 ou 7 do ciclo estral (dia 0 = dia da emergência folicular). A proporção de CCOs que desenvolveram até o estágio de

blastocisto foi maior naqueles coletados no dia 5 (23%) após a emergência, do que nos coletados nos dias 2 (12%), 3 (13%) ou 7 (16%). Estes dados, segundo os autores não suportam a hipótese de que haja um efeito do CL sobre o desenvolvimento embrionário, porém há uma correlação positiva entre a atresia recente e a competência ovocitária.

Estes trabalhos concordam que as características morfológicas dos ovócitos, avaliadas subjetivamente, não são preditivas na identificação da competência ovocitária. Baseado nestes conhecimentos de como é a formação e ativação dos ovócitos, vários trabalhos têm sido publicados no intuito de aumentar as taxas de PIV, seja utilizando métodos para melhorar a qualidade de ovócitos *in vivo*, bem como pela modificação dos protocolos de PIV. Outras alternativas visam aumentar a recuperação ovocitária utilizando hormônios que manipulem a onda folicular. Apesar de todas as alternativas para melhorar as taxas de PIV, não foi descrito até o momento, um marcador adequado para avaliar a competência de desenvolvimento dos ovócitos (Lequarre *et al.*, 2004), ainda que o diâmetro folicular (Pavloq *et al.*, 1992, Blondin & Sirard, 1995), o nível de atresia (Hagemann *et al.*, 1999; Wit & Kruip, 2001) e a concentração de progesterona no fluido folicular (Hazeleger, 1995) possam ser bons indicadores. O desenvolvimento da competência ovocitária, também é correlacionado com a morfologia do complexo cúmulus-ovócito (CCO) (Blondin & Sirard, 1995 e Boni *et al.*, 2002) e a morfologia da corona radiata (Laurincik *et al.*, 1996).

A seguir serão descritas algumas alternativas que utilizam diferentes métodos para melhorar as taxas de produção *in vitro*.

2. Alternativas que visam melhorar a eficiência da PIV

Um número variado de diferentes técnicas e protocolos para o tratamento de doadoras de ovócitos têm sido descritos a fim de melhorar as taxas de recuperação de CCOs *in vivo* e o desenvolvimento da competência dos ovócitos coletados *in vivo*.

No intuito de melhorar as taxas de PIV de bovinos, Ward *et al.* (2000) demonstraram, utilizando a técnica de punção folicular (PF) guiada por ultra-som, a influência da pressão do vácuo de aspiração na obtenção de ovócitos e na qualidade dos ovócitos recuperados. Neste estudo verificaram que pressões acima de 50 mm Hg (milímetros de mercúrio) diminuem a taxa de recuperação ovocitária e a recuperação de ovócitos de qualidade I aumentando, porém, o número de ovócitos desnudos.

Dentre os protocolos realizados em doadoras de ovócitos podem ser citados tratamentos com gonadotrofinas (Walton *et al.*, 1993), GnRH (Bordignon *et al.*, 1996), imunização anti-inibina (Konishi *et al.*, 1996) e gonadotrofinas com BST (Hwang *et al.*, 1997; Pivato, 2001). Os tratamentos com FSH utilizando diferentes dosagens antes da PF melhoram o número de ovócitos coletados e a produção de embriões comparados às vacas não estimuladas (Walton *et al.*, 1993; Gibbons *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994; Stubbings & Walton, 1995; Guyader *et al.*, 1997; Goodhand *et al.*, 1999).

Outros trabalhos sugerem diferentes dias do ciclo estral para realização da punção (dias 3–4, 9–10, ou 15–16 dias após o cio) (Pieterse *et al.*, 1991) e diferentes intervalos entre as PFs com punções após 48 e 96 h (Simon *et al.*, 1993), uma vez por semana (Goodhand *et al.*, 1999) ou duas vezes por semana (Gibbons *et al.*, 1994). O período compreendido entre 2 sessões de punções influencia a taxa de produção de embriões (Merton *et al.*, 2003). Este estudo sugere que a melhor taxa de recuperação de CCOs ocorre quando o intervalo entre as punções é de 7 dias, comparado aos protocolos que usam intervalos de 3 ou 4 dias. Porém, a taxa de produção de embriões/ovócitos é menor. Já, Galli *et al.*, (2001) observaram que a PF duas vezes por semana produz um número máximo de ovócitos recuperados de qualidade apropriada para a PIV. O método de punção contínuo, duas vezes por semana, demonstra a influência das punções no ciclo estral através de modificações na função endócrina e nos mecanismos de

crescimento folicular, conduzindo a intervalos estrais irregulares (Stubblings & Walton, 1995) ou ausência do cio (Gibbons *et al.*, 1994; Boni *et al.*, 1997). Frequentes sessões de punção seriadas podem resultar na ausência ou disfunção do corpo lúteo (CL) e inadequada produção de progesterona (Carlin *et al.*, 1999; Petyim *et al.*, 2001). Takenouchi *et al.* (2001) sugeriram que se as PFs fossem restritas aos dias 0 e 12 do ciclo estral, a influência na dinâmica folicular poderia ser diminuída ou mesmo abolida. Bage *et al.* (2001) também demonstraram que em esquemas de punção duas vezes por semana, restritos à primeira metade do ciclo estral, as novilhas apresentavam intervalo do ciclo estral normal. Em contraste com o comumente utilizado, punções com 3 e 4 dias de intervalo, a PF em intervalos de 2 e 5 dias não afetou o número de ovócitos coletados por sessão; no entanto a qualidade dos CCO's e a taxa de blastocisto foram maiores no intervalo de dois dias, o que pode ser atribuído ao efeito do FD na atresia dos folículos subordinados (Merton *et al.*, 2003).

Goodhand *et al.*, (2000) utilizaram tratamentos com progestágenos e estradiol em vacas submetidas à sessões de punção folicular, não encontrando diferenças no número de folículos puncionados, ovócitos recuperados e produção de embriões. Porém quando o FSH foi associado a estes tratamentos, houve aumento do número de folículos aspirados e da recuperação de ovócitos de qualidade I. Já quando o FSH foi administrado em doses múltiplas houve um aumento do número de embriões transferíveis.

Tem-se utilizado o r-bST (somatotrofina bovina recombinante), no intuito de favorecer as taxas de PIV, associado à gonadotrofinas que visam aumentar a população de folículos (Gong *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 1994; Pivato, 2001). O efeito do bST parece ser mediado pelo aumento das concentrações de IGF-I e insulina, entretanto, não pode ser desconsiderado algum efeito do próprio bST (Pivato, 2001). Tanto a insulina,

isoladamente ou em combinação com gonadotrofinas, mostram efeito na proliferação e esteroidogênese em cultivos de células da granulosa bovina (Webb *et al.*, 1994). Pivato (2001) ao comparar vacas que foram puncionadas sob estimulação de gonadotrofinas com bST e sem bST, observou que os animais tratados com bST apresentaram maior número de ovócitos do que aqueles que não foram tratados, porém não houve diferença na taxa de clivagem e de blastocistos entre os grupos. Outro estudo comparando o efeito do bST, foi realizado por Bols *et al.* (1998), comparando vacas que receberam 640 mg de r-bST semanalmente por 6 semanas consecutivas e vacas que receberam placebo, com punções 2 vezes por semana. Neste trabalho não foi registrado diferença no número de ovócitos coletados, tampouco do número de blastocistos por grupo.

Alguns esquemas de punções sugerem o uso de FSH para melhorar a viabilidade da PIV (Greve *et al.*, 1995; Bordignon, *et al.*, 1996; Blondin *et al.*, 1997; Goodhand *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2001; Merton *et al.*, 2003). Blondin *et al.* (1997) registraram uma ótima competência ovocitária quando o período pré-estimulação com FSH e a recuperação ovocitária foi de 48 horas, o que indica que neste período ocorrem mudanças nos CCO's similares às aquelas ocorridas no processo de pré-maturação. A retirada mecânica dos CCOs dos folículos, ocasionada pela PF, induz uma pré-maturação ovocitária. Alguns trabalhos sugerem que a administração de GnRH pré-PF, após a estimulação folicular com FSH, poderia melhorar a qualidade ovocitária através da padronização do estágio de maturação dos ovócitos, desta forma, aumentando as taxas de produção de blastocistos, no entanto, Pivato (2001) não observou diferença na qualidade dos ovócitos coletados, quando comparou 2 esquemas de punção que utilizavam FSH e GnRH, sendo que, este último 10 ou 20 horas antes da PF.

Outra alternativa que visa aumentar a população folicular é através da imunização ativa ou passiva contra a ação biológica da inibina. Esse procedimento foi

inicialmente testado em ovelhas e resultou em aumento na concentração plasmática de FSH (Findlay *et al.*, 1989) e no número de ovulações por ciclo (Mizumachi *et al.*, 1990). A imunização ativa contra a inibina tem sido utilizada para aumentar a taxa de duplas ovulações em bovinos (Scanlon *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1995).

Viana *et al.* (2003) trabalharam com 3 grupos de animais da raça Gir, utilizando Crestar[®], como fonte de progesterona exógena, substituído a cada 14 dias. Um grupo recebeu FSH (G1) durante as sessões de PF, outro grupo foi tratado com anti-inibina suína (G2) e o grupo controle recebeu somente o progestágeno (GC). Neste estudo foi registrado um aumento no número de ovócitos de qualidade I do G1 em relação ao GC. Os autores relacionaram estes resultados ao fato do G1 apresentar um número elevado de folículos maiores, facilitando, desta forma, o fluxo laminar da coleta pelo aumento do líquido folicular e por apresentar menores níveis de atresia do que o GC.

Em um trabalho realizado por nossa equipe (Pfeifer *et al.*, 2005) foi possível observar que animais submetidos à tratamentos com progesterona exógena apresentam maior número de folículos aptos à punção, maior número de ovócitos coletados e aumento da qualidade ovocitária em relação às vacas que não receberam progesterona, este fato deve estar ligado aos diferentes níveis de atresia ao qual estão submetidos os folículos e ovócitos destes grupos.

Ainda são necessários mais estudos e avaliações que demonstrem quais são os mecanismos envolvidos na qualidade ovocitária, afim de que se possam buscar novas alternativas de aumentar os índices da PIV.

Como já mencionado anteriormente, até o presente momento não existe um critério totalmente eficiente de avaliação da qualidade de ovócitos e sua correlação com a futura produção de embriões *in vitro* (Lequarre *et al.*, 2004). Algumas formas de melhorar tais critérios para se ter uma correlação mais positiva entre os ovócitos e

embriões produzidos ainda estão sendo estudadas. Alguns estudos têm buscado novas formas de avaliação da qualidade ovocitária (Vassena *et al.*, 2003; Lequarre *et al.*, 2004). Lequarre *et al.* (2004), por exemplo, avaliaram a energia de metabolização no início e no fim do período de maturação, mensurando o aumento de oxigênio e de piruvato, além da liberação de lactato e da avaliação do transcriptoma em ovócitos imaturos. Estas observações são realizadas através do padrão de síntese protéica antes e depois da maturação *in vitro* e da avaliação da cinética da maturação nuclear, visto que o momento da extrusão do primeiro corpúsculo polar é associado com o subsequente desenvolvimento embrionário.

CONCLUSÃO

A partir das considerações apresentadas nesta revisão é possível verificar a importância de um maior entendimento dos fatores que estão envolvidos no processo de PIV, a fim de permitir o estudo de novas alternativas que incrementem os resultados obtidos em programas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AALTONEN, J., LAITINEN, M.P., VUOJOLAINEN, K., JAATINEN, R., HORELLI-KUITUNEN, N., SEPPA, L., LOUHIO, H., TUURI, T., SJOBERG, J., BUTZOW, R., HOVATA, O., DALE, L., RITVOS, O. Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, V.84, p. 2744–2750, 1999.
- ABEL, M.H., WOOTTON, A.N., WILKINS, V., HUHTANIEMI, I., KNIGHT, P.G., CHARLTON, H.M. The effect of a nullmutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, 141, 1795–1803, 2000.

- ADAMS, G. P., MATTERI, R. L., KASTELIC, J. P., KO, J. C. H., GINTHER, O. J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v. 94: p. 177-88, 1992.
- ASSEY, R.J., HYTTEL, P., GREVE, T., PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 335–344, 1994.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.C.O., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, V. 64, p. 839–848, 2001.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.O.C., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and growth and differentiation of first wave follicles during the estrous cycle of beef heifers. *Reproduction*, v. 124, p. 531–541, 2002.
- BAGE, R., PETYIM, S., LARSSON, B., GUSTAFSSON, H., FORSBERG, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Repeated OPU on days 0-12 of the oestrus cycle allows normal cyclicity in dairy heifers. In: PROCEEDINGS OF THE 5TH ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION (ESDAR), Vienna, Austria; 50 (abstract), 2001
- BAKER, T.G., FRANCHI, L.L. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v. 14, p. 511–513, 1967.
- BAKER, T.G., HUNTER, R.H.F. Oogenesis and follicular growth in the cow: implications for superovulation. In: Sreenan J.M. (Ed.), *Control of Reproduction in the Cow*. CEC Publications, Luxembourg, p. 34–49, 1978.
- BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J., VAN DER HURK, R., IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47: 13-22, 1997.

BLONDIN, P., GUIBAULT, L., SIRARD, M.A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, v. 48, p. 803–813, 1997.

BLONDIN, P., SIRARD, A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 41, p. 54-62, 1995.

BODENSTEINER, K.J., CLAY, C.M., MOELLER, C.L., SAWYER, H.R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.*, v. 60, p. 381, 1999.

BOLS, P. E. J., YSEBAERT, M. T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF Program. *Theriogenology*, v. 49: p. 983-995, 1998.

BOLS, P.E.J., VANDENHEEDE, J. M. M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v. 43, p. 677-87, 1991.

BOLS, P.E.J., VAN SOOM, A., KRUIF, A. The use of transvaginal ovum pick-up: first OPU calves born in Belgium. *Merelbeke*, p. 141-152, 1997.

BONI R, CUOMO A, TOSTI E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus–oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 836–42, 2002.

BONI, R. ROELOFSEN, M. W. M., PIETERSE, M. C., KOGUT, J., KRUIP, TH. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular retirement in cows undergoing repeat follicular puncture. *Theriogenology*, v. 48, p. 277-89, 1997.

- BORDIGNON, V., MORIN, N., DUROCHER, J., BOUSQUET, D., SMITH, L.C. Effects of GnRH injection on recovery rate, meiotic synchronization and developmental competence of oocytes aspirated from superstimulated heifers. *Theriogenology*, v. 45, p. 352, 1996.
- BRACKETT, B.G. In vitro fertilization in farm animals. In: LAURIA, A., GANDOLFI, F. EMBRYONIC DEVELOPMENT AND MANIPULATION IN ANIMAL PRODUCTION. London, Portland Press, p. 59-76, 1992.
- BRACKETT, B.G., ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 39, p. 43-64, 1993.
- BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, v. 109, p. 165–171, 1997.
- BUNGARTZ, L., NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 583-91, 1994.
- CAMPBELL, B.K., PICTON, H.M., MANN, G.E., MCNEILLY, A.S., BAIRD, D.T. Effect of steroid- and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fert.*, 93, 81–96, 1991.
- CARLIN, S, K. GARST, A. S., TARRAF, C. G., BAILEY, T. L., MCGILLIARD, M. L., GIBBONS, J.R. Effects of ultrasound guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. *Theriogenology*, v. 51, p. 1489-503, 1999.
- CROWE, M.A., BAO, B., MIHM, M., ROCHE, J.F., WILLIAMS, D.H., GARVERICK, H.A. Effects of LH on gonadotrophin receptor and steroid enzyme messenger RNA (mRNA) expression during normal and delayed dominant follicle (DF) selection in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, abstract series 25, 35 (abstract no. 82), 2000.

CROWE, M.A., KELLY, P., DRIANCOURT, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunised heifers. *Biol. Reprod.*, 64, 368–374, 2001.

CUSHMAN, R.A., DESOUZA, J.C., HEDGPETH, V.S., BRITT, J.H. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. *Biol. Reprod.*, 65, 581–586, 2001.

DEKEL, N., ABERDAN, E., GOREN, S., FELDMAN, B., SHALGI, R. Mechanism of action of Ngr.-induced oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil. (suppl)*, 37: 319–327, 1989.

DONG, J.W., ALBERTINI, D.F., NISHIMORI, K., KUMAR, T.R., LU, N.F., MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v. 383, p. 531–535, 1996

DURLINGER, A.L., VISSER, J.A., THEMME, A.P. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. *Reproduction*, 124, 601–609. 2002.

ELVIN, J.A., CLARK, A.T., WANG, P., NISHIMORI, K., MATZUK, M.M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol. Endocrinol.*, v. 13, p. 1018–1034, 1999.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829–938, 2001.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. *J. Anim. Sci.*, v. 25, p. 800–805, 1966.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence *Anim. Reprod. Sci.*, v. 78, p. 203–216, 2003.

FAIR, T., HULSHOF, S.C.J., HYTTEL, P., BOLAND, M., GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anat. Embryol.*, v. 195, p. 327–336, 1997.

FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 437–442, 1995.

FINDLAY, J.K., DOUGHTON, B., ROBERTSON, D.M. et al. Effects of immunization against recombinant bovine inhibin α -subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. *J. Endocrinol.*, v. 120, p. 59-65, 1989.

FISSORE, R. A., HE, C. L., WOUDE, G. F. V. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 55: 1261-1270, 1996.

GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C., TURINI, P., LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-57, 2001.

GIBBONS, J.R., BEAL, W.E., KRISHER, R.L., FABER, E.G., PEARSON, R.E., GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405–419, 1994.

GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C., FRICKE, P. M., GIBBONS, J. R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-94, 1996.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. *Reproduction*, v.122, p.103–110, 2001.

GONG, J.G., BRAMLEY, T., WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, v.45, p.941–949, 1991.

GONG, J.G., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 105, 263–270, 1995.

GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R.. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, v.55, p.68–74, 1996.

GOODHAND, K. L., STAINES, M. E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.145-158, 2000.

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

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

GUYADER, JOLY.C., PONCHON, S., THUARD, J.M., DURAND, M., NIBART, M., MARQUANT-LE GUIENNE, B., HUMBLLOT, P. Effect of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology*, v.47, p. 157, 1997.

HAGEMANN L, BEAUMONT S, BERG M, DONNISON M, LEDGARD A, PETERSON A, ET AL. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.*, v.53, p.451–8, 1999a.

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

HAYASHI, M., MCGEE, E.A., MIN, G., KLEIN, C., ROSE, U.M., VAN DUIN, M., HSEUEH, A.J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, v.140, p.1236-1244, 1999.

HAZELEGER NL, HILL DJ, STUBBING RB, WALTON JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocyte to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, v.43, p.509-22, 1995.

HOMA, S. T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 122-134, 1995.

HSU, C.J., HOLMES, S.D., HAMMOND, J.M. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 242-247, 1987.

HSUCH, A. J. W., BILLIG, H., TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.*, v.15, p.707-24, 1994.

HWANG, W.S., LEE, K.N., LEE, B.C. Effect of bST co-treatment with FSH or PKSG on transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in calves. *Theriogenology*, v.47, p.159, 1997.

JAATINEN, R., LAITINEN, M.P., VUOJOLAINEN, K., AALTONEN, J., LOUHIO, H., HEIKINHEIMO, M., RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homologue GDF-9B. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.156, p.189-193, 1999.

- JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J. K., TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428: 145-150, 11 march, 2004.
- KONISHI, M., AOYAGI, Y., TAKEDOM, T., ITAKWA, H., ITOH, T., YAZAWA, S., KISHI, H., TAYA, K., WATANABE, G., KANAGAWA, H. Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*, v.46, p.33–43, 1996.
- LAURINCIK J, HYTTEL P, BARAN V, SCHMOLL F, NIEMANN H, BREM G, ET AL. Corona radiata density as a noninvasive marker of bovine cumulus–corona-complexes selected for in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.46, p.369–77, 1996.
- LAW, A.S., LOGUE, D.N., O'SHEA, T., WEBB, R. Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying estrous in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 96, 603–616, 1992.
- LEE, W.S., OTSUKA, F., MOORE, R.K., SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol. Reprod.*, 65, 994–999, 2001.
- LEQUARRE, A-S., VIGNERON, C., RIBAUCCOUR, F., HOLM, P., DONNAY, I., DALBIE'S-TRAN, R., CALLESEN, H., MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, (2004) (IN PRESS).
- LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v.41, p.67–72, 1994.

- LUSSIER, J. G., LAMONTHE, P., PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology*, v.43, p.270 (abstract), 1995.
- LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 301–307, 1987.
- MATTON, P., ADELAOUN, V., COUTURE, Y., DUFOUR, J.J. Growth and replacement of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 37, 48–53, 1981.
- MCGRATH, S.A., ESQUELA, A.F., LEE, S.J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.*, v.9, p.131–136, 1995.
- 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, p.651-674, 2003.
- MIHM, M., BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 78 217–237, 2003.
- MIHM, M., GARVERICK, H.A., BAO, B., ROCHE, J.F., CROWE, M.A. Effects of extending the transient FSH rise during the first follicle wave in heifers on follicular gonadotrophin receptor and steroid enzyme messenger RNA (mRNA) expression. *J. Reprod. Fertil.*, abstract series 25, v.55 (abstract no. 142), 2000.
- MIHM, M., GOOD, T.E.M., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., KNIGHT, P.G., ROCHE, J.F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1328–1337, 1997.

- MIZUMACHI, M., VOGLMAYR, J.K., WASHINGTON, D.W. et al. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin α -subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle-stimulating hormone levels. *Endocrinology*, v.126, p.1058-1063, 1990.
- MONNIAUX, D., PISSELET, C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle stimulating hormone in vitro. *Biol. Reprod.*, 46, 109–119, 1992
- MORRIS, D.G., McDERMOTT, M.G., GREALLY, M. et al. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of the α_N -subunit of bovine inhibin on ovulation rate, gonadotrophin concentrations and fertility in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.103, p.285-291, 1995.
- NILSSON, E.E., KEZELE, P., SKINNER, M.K. Leukaemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 188, 65–73, 2002.
- NILSSON, E.E., SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1018–1024, 2002.
- O'SHEA, T., HILLIARD, M.A., ANDERSON, T., BINDON, B.M., FINDLAY, J.K., TSONIS, C.G., WILKINS, J.F. Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. *Theriogenology*, 41, 3–17, 1994.
- OTSUKA, F., YAO, Z., LEE, T., YAMAMOTO, S., ERICKSON, G.F., SHIMASAKAI, S. Bone morphogenetic protein-15. *J. Bio. Chem.*, 275, 39523–39528, 2000.
- PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. *Endocrinology*, 138, 3819–3827, 1997.

PAVLOK A, LUCAS-HAHN A, NIEMANN H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.31, p.63–7, 1992.

PETYIM, S., BAGE, R., FORSBERG, M. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. LARSSON, B. Effects of repeated follicular puncture on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J. Vet. Med. Anim.*, v.48, p.449-63, 2001.

PFEIFER, L. M. *Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção in vitro de embriões*. Dissertação de Mestrado. Reprodução animal. Universidade Federal de Pelotas 2001, 62 p. Pelotas.

PIETERSE, M. C., VOS, P. L. A. M., KRUIP, TH. A. M., WILLEMSE, A. H., TAVERNE, M. A. M. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413, 1991.

PIVATO, I. *Efeito de diferentes tratamentos hormonais e da nutrição em doadoras de ovócitos na produção de embriões bovinos in vitro*. Tese. Biotecnologia, Centro de Biotecnologia. Universidade de Pelotas, 62 p. Pelotas, 2001.

ROTH, Z., ARAV, A., BOR, A., ZERON, Y., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122, 737–744, 2001.

SARTORI, R., HAUGHIAN, J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G. J. M., WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Science*, 87: 905-920, 2004.

SCANLON, A.R., SUNDERLAND, S.J., MARTIN, T.L. et al. Active immunization of heifers against a synthetic fragment of bovine inhibin. *J. Reprod. Fertil.*, v.97, p.213-222, 1993.

SIMON, L., BUNGARTZ, L., RATH, D., NIEMAN, H. Repeated bovine oocytes collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, v.39, p.312 (abstract), 1993.

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

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

TAKENOUCHI, N., HIRAO, Y., KOSUKE, I., SHIMIZU, M., GESHI, M., NAGAI, T. The effect of inhibin immunization on the results of ovum pick-up in Japanese Black cow. In: PROC. 94TH ANNUAL MEET JAP SOC ANIM. REPROD., v.1, p.71 (abstract), 2001.

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, p.923–932, 2003.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., CAMARGO, L.S.A. Effect of ovarian pre-stimulation on the ultrasound-guided follicular puncture. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.1, p.68-74, Feb. 2003.

VITT, U.A., MAZERBOURG, S., KLEIN, C., HSUEH, A.J. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol. Reprod.*, v.67, p.473–480, 2002.

VITT, U.A., MCGEE, E.A., HAYASHI, M., HSUEH, A.J.W. In vivo treatment GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CyP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, v.141, p.3814–3820, 2000.

WALTON, J.S., CHRISTIE, K.A., STUBBINGS, R.B. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology*, v.39, p.336, 1993.

WARD, F. A., LONERGAN, P., ENRIGHT, B. P., BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, v.54, p.433-446, 2000.

WEBB, R., GONG, J. G., BRAMLEY, T. A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology*, v.41, p.25-30, 1994.

WISE, T., SUSS, U., STRANZINGER, G., WUTHRICK, K., MAURER, RR. Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrus period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Dom. Anim. Endocrinology*, 11: 59-86, 1994.

WIT A. A., KRUIP, T. A. Bovine cumulus–oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.*, v.65, p.51–65, 2001.

WIT, A.A.C., WURTH, Y. A., KRUIP, Th. A .M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1277-1283, 2000.

WOLFSDORF, K.E., DIAZ, T., SCHMITT, E.J.P., THATCHER, M.J., DROST, M., THATCHER, W.W. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology*, 48, 435–447, 1997.

WOOD, S.C., GLENCROSS, R.G., BLEACH, E.C., LOVELL, R., BEARD, A.J., KNIGHT, P.J. The ability of steroid—free bovine follicular fluid to suppress FSH secretion and delay ovulation persists in heifers actively immunized against inhibin. *J. Endocrinol.*, 136, 137–148, 1993.

XU, Z. Z., GARVERICK, H. A., SMITH, G. W., SMITH, M. F., HAMILTON, S. A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of FSH and LH receptor mRNA in bovine follicles during the first follicle wave. *Biol. Reprod.*, 53: 951-958, 1995.

PAPER 2:

**EFEITO DA PROGESTERONA EXÓGENA EM VACAS
DOADORAS DE OVÓCITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

(Artigo formatado de acordo com a revista Theriogenology)

1 **EFEITO DA PROGESTERONA EXÓGENA EM VACAS DOADORAS DE OVÓCITOS**
2 **SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE**
3 **EMBRIÕES¹**

4
5 **EFFECT OF PROGESTERONE EXOGEN IN OOCYTE DONORS COWS IN THE**
6 **FOLLICLE DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION¹**

7
8 L. F. Pfeifer*²; M. N. Correa³; I. Pivato⁴; R. Rumpf⁵; N. J. L. Dionello⁶

9
10 ^{2,3} Faculdade de Veterinária, NUPEEC – Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária. -
11 96010 900 - Pelotas/RS

12 ⁴ CIDASC- Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrário de Santa Catarina, 89130 000,
13 Indaial- SC, Brasil

14 ⁵ EMBRAPA-Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia. -70770 901- Brasília-
15 DF, Brasil

16 ⁶ Faculdade de Agronomia - Universidade Federal de Pelotas - 96010 900 - Pelotas/RS

17

18

19

20

21

22

¹ * Corresponding author. Tel.: + 55 53 2757506

E-mail address: lpfeifer@ufpel.edu.br - www.ufpel.edu.br/nupeec

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária, área de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) como uma das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

23 **Resumo**

24 O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de folículos dispostos à punção folicular (PF), a
25 quantidade e a qualidade de ovócitos e a produção *in vitro* de blastocistos oriundos de doadoras
26 submetidas à diferentes tratamentos com progesterona. Para a realização deste experimento
27 foram utilizadas 15 vacas mestiças (*bos taurus x bos indicus*). Antes do início do experimento,
28 todas as vacas receberam por 8 dias um CIDR[®]. Dois dias antes da retirada dos dispositivos,
29 todas as vacas receberam 0,150 mg de D-cloprostenol. No dia da retirada dos CIDRs[®] todas
30 vacas foram submetidas à PF para favorecer uma padronização do crescimento folicular. Após
31 esta 1^o PF as vacas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos distintos e todas submetidas à
32 PF a cada 4 dias totalizando 6 sessões: G1: animais que receberam 1 CIDR[®] usado; G2: animais
33 que receberam 2 dispositivos novos, e G3: animais que não foram submetidos à tratamentos
34 com progesterona. As trocas dos CIDRs[®] do G1 e G2 foram realizadas a cada 8 dias, assim
35 como a aplicação de 0,150 mg de D-cloprostenol, nos três grupos. Os resultados demonstram
36 um aumento ($p<0,01$) na média de folículos pequenos, com diâmetro de até 5 mm, nos G1
37 (9,44) e G2 (9,44) em relação ao G3 (6,12). Houve diferença ($p<0,05$) na taxa de recuperação
38 apenas entre o G2 (68,77%) e G3 (47,19%), e um aumento ($p<0,01$) na média de ovócitos
39 coletados/vaca/punção do G1 (6,56) e G2 (6,96), em relação ao G3 (3,36). Também foi
40 observada diferença ($p<0,05$) na média de ovócitos de qualidade I e II por punção entre os
41 grupos 1 e 3, não havendo diferença ($p>0,05$) entre os grupos 1 e 2 e grupos 2 e 3, sendo: 13
42 para o G1, 5,6 para o G2 e 2,6 para o G3. A taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade I e II do
43 G1 (80%) foi superior ($p<0,05$) ao G2 (75%) e G3 (61,5%). A taxa de blastocistos, oriundos de
44 ovócitos de qualidade I e II foi superior ($p<0,05$), no G1 (46,15%) em relação ao G3 (15,38%),
45 porém não houve diferença do G1 para o G2 (32,14%) e do G2 para o G3. Não foi detectada
46 diferença ($p>0,05$) na taxa total de blastocistos entre os grupos G1, G2 e G3, sendo: 28,20%
47 ($6,6\pm2,15$), 16% ($3,8\pm2,15$) e 15% ($1,8\pm2,15$), respectivamente.

48 Os resultados indicam que vacas tratadas com implantes de progesterona apresentam aumento
49 da quantidade de ovócitos, bem como a disponibilidade de folículos aptos à punção. A

50 qualidade dos ovócitos de qualidade I e II recuperados e a taxa de produção de blastocistos
 51 oriundos de ovócitos de qualidade I e II foram maiores quando as doadoras eram submetidas a
 52 apenas 1 CIDR[®] reutilizado em relação à vacas que não receberam implantes, além de aumentar
 53 a taxa de clivagem de ovócitos de qualidade I e II em relação aos demais tratamentos. A taxa de
 54 clivagem total foi maior quando as vacas foram submetidas à tratamentos com progesterona,
 55 porém não houve diferença na taxa de blastocistos total entre os grupos.

56

57 **Palavras-chave:** qualidade de ovócitos, progesterona, produção in vitro, bovinos.

58

59 **Abstract:**

60 The aim of this work was to evaluate the follicles number able to follicular punction (FP), the
 61 quantity and quality of oocytes and the *in vitro* production of blastocysts from donors submitted
 62 to different treatments with progesteron. For this expireemnt were used 15 crowsbreed cows
 63 (*bos taurus x bos indicus*). Before the experiment beginning, all cows received a
 64 CIDR[®](intravagianl progesterone releaser dispositive). Two days before the dispositive
 65 withdraw, all cows received 0,150 of D-cloprotesnol, a prostaglandine analogue. In theretire day
 66 all cows were submitted to FP to make favorable a standard in the follicular growth. After this
 67 first FP the cows were randomically divided in three different groups and all submitted to FP at
 68 4 days in a total of 6 sections. G1: the animals received a used CIDR[®], being this dispositive
 69 changed after two FPs, being used 3 CIDR[®] per cow during the experiment.; the other two
 70 CIDR[®] changes were done using dispositives that were used by other cows from the other
 71 groups at the treatments beginning; G2: the animals, after the CIDR[®] withdraw, received 2 new
 72 dispositives which were changed after 8 days each; G3; these animals weren't submitted to
 73 progesterone treatments. The animals from the 3 groups received 0,150 mg of D-cloprostenol
 74 after 8 days each. The PIV results were compared to a control group (CG), formed by oocytes
 75 from ovaries of slaughterhouse. The results show an increasement ($p<0,01$) in the small follicles
 76 media, with 5mm of diameter, in G1 (9,44) and G2 (9,44) in relation to the G3 (6,12). There

77 was a difference ($p<0,05$) in the recuperation rate only between G2 (68,77%) and G3 (47,19%)
 78 and an increasement ($p<0,01$) in the collected oocytes/cow/punction of G1 (6,56) and G2 (6,96)
 79 in relation to G3 (3,36). It was also observed a difference ($p<0,05$) in the oocytes media with
 80 quality I and II among the G1 and G3, being 13 for G1, 5,6 for G2 and 2,6 for G3. The oocytes
 81 cleavage rate of I and II qualities of G1 (80%) was superior ($p<0,05$) to G2 (75%) and G3
 82 (61,5%). The blastocyst rate, coming from oocytes of I and II qualities was superior ($p<0,05$), in
 83 G1 (46,15%) in relation to G3 (15,38%), however, there was no different among G1 and G2
 84 (32,14%). It wasn't observed difference ($p>0,05$) in the blastocysts total rate between the
 85 groups, being 28,20%, 16% and 15% for G1, G2 and G3, respectively. The results show that the
 86 cows treated with 1 or 2 dispositives of progesterone show an increasement of oocytes quantity,
 87 as well as follicles able to the punction. The oocytes of qualities I and II recovered and the
 88 blastocysts rate production coming from oocytes of I and II qualities was bigger when the
 89 donors were submitted to an only CIDR[®] reused in relation to cows that was no treated, above
 90 increasement the cleavage rate of the oocytes from qualities I and II in relation to the other
 91 groups. The cleavage rate was bigger when the cows was submitted to treatments with
 92 progesterone, however it no was difference in the rate of total blastocysts production between
 93 the groups.

95 **Keywords:** oocytes quality, progesterone, Production in vitro and cattle.

97 1. Introdução

98 O grande avanço obtido na área de biotecnologia da reprodução tem permitido o
 99 desenvolvimento de biotécnicas que aumentam a eficiência reprodutiva e o ganho genético em
 100 rebanhos bovinos, bem como, permitem o estudo e aperfeiçoamento de técnicas de reprodução
 101 assistida. Entretanto, os protocolos e métodos utilizados ainda requerem aperfeiçoamentos [1].
 102 É neste âmbito que a técnica de punção folicular (PF) guiada por ultra-som possibilita
 103 maximizar o aproveitamento de ovócitos que fisiologicamente sofreriam atresia e possuem
 104 potencial de produção de embriões *in vitro* [2].

105 Apesar dos progressos obtidos neste campo, a eficiência da produção de embriões transferíveis
106 oriundos de fertilização *in vitro* (FIV) ainda é baixa. Somente 20 a 30% dos complexos
107 cúmulus-ovócitos (CCO) coletados por punção folicular atingem o estágio de blastocisto após a
108 produção de embriões *in vitro* [3]. Muitos destes resultados têm sido atribuídos às condições de
109 maturação e fertilização *in vitro*. No entanto, a inabilidade de melhorar a produção de embriões
110 *in vitro* pode ser um resultado inerente ao desenvolvimento da competência de ovócitos
111 coletados de pequenos folículos (2–6 mm de diâmetro) [4].

112 Existem indicações de que este fato esteja mais relacionado com a qualidade dos ovócitos do
113 que com as condições de fertilização e cultivo *in vitro* e/ou devido ao método de maturação *in*
114 *vitro* dos ovócitos coletados [5]. Normalmente, os ovócitos utilizados para a produção de
115 embriões *in vitro* (PIV), são originários de folículos com 3 a 8 mm de diâmetro, sendo que estes
116 são muito heterogêneos quanto ao estágio de desenvolvimento e atresia, sendo submetidos a
117 maturação *in vitro* antes mesmo de terem passado pelo período pré-ovulatório [6].

118 Alguns estudos indicam que ovócitos oriundos de folículos que tiveram seu desenvolvimento na
119 fase de diestro do ciclo estral são de melhor qualidade, sugerindo que ovócitos desenvolvidos
120 em um ambiente com maior concentração de progesterona (P4) seriam de melhor qualidade
121 [4,5]. Alguns trabalhos sugerem que a progesterona tem importante função na qualidade
122 embrionária [7, 8, 9]. Nasser *et al.* [9] em um trabalho usando a primeira onda folicular para
123 superovular vacas, ou seja, utilizando o tratamento superestimulatório em baixas concentrações
124 de P4, observaram que o número de embriões transferíveis foi menor do que os tratamentos
125 superestimulatórios tradicionais com início no D8 ou D9, no meio do ciclo estral. Como o LH
126 possui características de aumentar indiretamente a esteroidogênese aumentando os níveis de
127 atresia, a hipótese deste trabalho é que de acordo com o nível plasmático que a P4 atingir em
128 cada tratamento, os pulsos de LH serão diminuídos ou abolidos, influenciando diretamente a
129 qualidade dos ovócitos e a foliculogênese durante as sessões de punção folicular (PF). A
130 redução da atresia ainda pode ser influenciada devido à inibição do declínio de FSH em função
131 da aspiração contínua dos pequenos folículos em desenvolvimento [10].

132 Este estudo teve o objetivo de avaliar o número de folículos aptos à PF, a quantidade e a
133 qualidade de ovócitos, bem como a produção de embriões *in vitro* de vacas doadoras de
134 ovócitos submetidas à diferentes tratamentos com dispositivos liberadores de progesterona
135 (CIDR[®]).

136 2. Materiais e Métodos

137 O experimento foi realizado na Fazenda Experimental Sucupira da EMBRAPA – CENARGEN
138 (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia) localizada na região de cerrado, em
139 Brasília/Distrito Federal. O experimento foi realizado entre o período chuvoso e seco, durante
140 os meses de maio e junho de 2004.

141 2.1. Grupos Experimentais

142 Para a realização deste experimento foram utilizadas 15 vacas com idades entre 3 e 7 anos,
143 mestiças (*bos taurus* x *bos indicus*), com peso entre 425 e 565 Kg e condição corporal (CC)
144 entre 3 e 3,5, em regime de pastagem (*Brachiaria brizanta*) recebendo suplementação mineral
145 (sal proteinado – EMBRAPA Cerrados). Antes do início do experimento, todos animais foram
146 submetidos ao exame ginecológico por ultrasonografia (Aloka SSD 500, Aloka Co., Japan)
147 equipado com transdutor linear de 5 MHz, sendo observado que todas as fêmeas estavam
148 ciclando. Após o exame de ultra-som, todas as vacas receberam um CIDR[®] (dispositivo de
149 silicone em forma de T liberador de progesterona) (1,9 g de progesterona/dispositivo) por 8
150 dias. Dois dias antes da retirada dos dispositivos, todas as vacas receberam 0,150 mg de D-
151 cloprostenol (Prostaglandina Tortuga[®], im), um análogo de prostaglandina, para descartar a
152 presença de um corpo lúteo desde o início do experimento evitando a influência de progesterona
153 endógena nos tratamentos.

154 No dia da retirada dos CIDR[®]s todas vacas foram submetidas à PF, para que promover a
155 padronização do crescimento folicular entre as vacas. Após esta 1^o PF as vacas foram divididas
156 aleatoriamente em 3 grupos distintos e todas submetidas à PF a cada 4 dias totalizando 6
157 sessões. A seguir é descrita a metodologia adotada para cada grupo experimental:

158 Grupo 1 (G1): Este grupo era composto por 5 animais que, para obtenção de baixos níveis de
159 progesterona sérica, receberam 1 CIDR[®] usado, ou seja, as fêmeas que já estavam a 8 dias com

um dispositivo, permaneceram com o mesmo CIDR[®] por mais 8 dias. O CIDR[®] foi trocado no intervalo entre duas PFs de forma que foram utilizados 3 CIDRs por vaca durante as 6 PFs. As outras duas trocas de CIDR[®] foram feitas utilizando os dispositivos que haviam sido usados pelas vacas dos outros grupos no início dos tratamentos. No momento das trocas do CIDR[®] era aplicado D-cloprostenol (Prostaglandina Tortuga[®], im) na concentração de 0,150 mg (Figura 1). Grupo 2 (G2): Este grupo era composto por 5 animais que, para obtenção de níveis mais altos de progesterona sérica que o G1, receberam 2 CIDR[®]s novos. Os CIDR[®]s foram trocados a cada 8 dias coincidindo com as aplicações de D-cloprostenol (Prostaglandina Tortuga[®], im) na mesma concentração do G1 (Figura 1, em anexo). Grupo 3 (G3): Este grupo era composto por 5 animais que não foram submetidos a tratamentos com progesterona e somente receberam uma aplicação de D-cloprostenol (Prostaglandina Tortuga[®], im) na mesma concentração do G1, a cada 8 dias após a retirada do CIDR[®], que antecedeu o início do experimento (Figura 1, em anexo). Os grupos experimentais foram separados de acordo com os resultados prévios dos níveis séricos de progesterona registrados em um trabalho realizado por nossa equipe, sendo que animais que receberam dois CIDR[®]s atingiram concentração sérica de progesterona acima de 2 ng/ml e vacas que receberam somente 1 CIDR usado atingiram níveis de P4 sérica menores de 2 ng/ml [11]. Os CIDR[®]s eram trocados a cada 8 dias no G1 e G2 para que os níveis séricos de P4 não ficassem abaixo do estipulado para cada grupo. Para que os tratamentos utilizados neste experimento estivessem somente sob o efeito da progesterona exógena, oriunda dos dispositivos intravaginais (CIDR[®]), era necessário a aplicação de uma dose de D-cloprostenol (Prostaglandina Tortuga[®], im), de 0,150 mg a cada 8 dias para evitar a formação de um corpo lúteo.

2.2. Punção Folicular

Para realização das PFs, as vacas receberam previamente uma anestesia epidural baixa, 5 a 7 ml de anestésico local (lidocaína 2%).

186 O método de aspiração folicular utilizado no experimento foi o descrito por Petyim *et al.* [12].
187 A PF foi realizada via transvaginal com um aparelho de ultrassom de marca Aloka 500[®],
188 equipado com sonda setorial convexa transvaginal de 5 MHz, adaptado a um sistema de agulhas
189 descartáveis (agulha para aspiração folicular, Handle Cook[®]), com 18 g° de diâmetro, acoplado
190 a um sistema de vácuo (bomba para aspirações foliculares, Handle Cook[®]) com aspiração
191 correspondendo a aproximadamente -75 a -85 mmHg. Foram puncionados todos os folículos
192 que possuíam diâmetro acima de 3 mm.

193 Os ovócitos aspirados foram retidos em tubo Falcon de 50 ml (Cornig[®]), sendo que o meio de
194 lavagem utilizado para PF foi Dulbecco PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino
195 (SFB), gentamicina e heparina 100 UI/mL. O material coletado das PFs foi filtrado (filtro
196 Milipore[®] para embrião) e lavado com PBS para facilitar o rastreamento.

197 A classificação dos ovócitos foi feita através da avaliação dos complexo-cumulus-ovócitos
198 (CCOs) coletados nas sessões de PFs. O rastreamento foi realizado em placa de *petri* através de
199 lupa estereomicroscópica para avaliação morfológica de sua qualidade. Os CCOs foram
200 classificados em 4 categorias de acordo com a classificação proposta por Leibfried & First [13]:

201 I - Ovócitos com *cumulus* compacto e mais de três camadas de células. Ooplasma com
202 granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração
203 marrom.

204 II - Ovócitos com menos de três camadas de células do *cumulus oophorus*. Ooplasma com
205 granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais
206 claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma
207 preenche todo espaço interior da zona pelúcida.

208 III – Ovócitos que possuem o *cúmulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com
209 espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço
210 perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado.

211 IV - Ovócitos desnudos sem células do *cúmulus*, citoplasma com cor e granulação anormais ou
212 com células expandidas com aspecto apoptótico.

Os ovócitos classificados nas categorias I e II foram considerados como de boa qualidade e os das categorias III e IV como de má qualidade. Todos ovócitos coletados, bem como àqueles utilizados para o grupo controle do frigorífico, foram submetidos à PIV, exceto os ovócitos que apresentavam cúmulus extremamente expandido e ovócitos desnudos, pois comumente apresentam baixa eficiência na produção de embriões *in vitro* [14, 15, 16].

2.3. Coleta de ovócitos de ovários de abatedouro

Para controle da qualidade do procedimento de PIV do Laboratório de produção *in vitro* da Fazenda Experimental Sucupira – EMBRAPA-CENARGEN, foi realizado paralelamente à FIV dos ovócitos coletados nas PFs, FIV de ovócitos coletados de abatedouro. Os ovócitos que constituíram este grupo, foram provenientes de ovários de vacas mestiças abatidas em abatedouro da região de Brasília, sendo transportados para o laboratório em solução salina 0,9% (NaCl - Sigma[®]), suplementada com estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100UI/ml) a 36°C. Os CCOs foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro com auxílio de um escalpe de 18ºg, acoplado a um tubo cônico de 15 ml (Corning[®]), ligados a um sistema de vácuo com pressão regulada para aspirar 15-20 ml de solução por minuto. Após a sedimentação do material aspirado, o *pellet* era retirado e colocado em uma placa de 100 x 20 mm contendo meio de bancada (TCM 199 sais de Hank's – Gibco BRL[®]), penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Os CCOs foram rastreados em lupa estereomicroscópica. Apenas os ovócitos de qualidade I e II foram selecionados para formar o GC. A classificação dos ovócitos utilizada também foi a proposta por Leibfried & First [13]. Não foi registrado diferença na taxa de blastocistos entre este grupo controle dos demais grupos experimentais.

2.4. Fertilização *in vitro* e cultivo embrionário

Os protocolos utilizados para maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro* foram adaptados de Dode *et al.* [17].

2.4.1. Maturação *in vitro*

Foram destinados à MIV somente aqueles CCOs (complexo cúmulus-ovócitos) com qualidade I, II e III, sendo descartados para MIV (maturação *in vitro*), os ovócitos com qualidade IV.

240 Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para uma placa contendo 2 ml de meio de
241 maturação coberto com 2 ml de óleo de parafina e incubados por 22 horas a 39°C e 5% de CO₂
242 em ar. O meio de maturação era constituído de TCM 199 sais de Earl's (Gibco BRL®), 24 UI/ml
243 de hormônio luteinizante (LH, Sigma®), 10 µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH,
244 Sigma®), 1 µg/ml L-glutamina (Sigma®), 100 UI/ml penicilina (Sigma®) e 50 µg/ml
245 estreptomicina (Sigma®).

246 **2.4.2. Fertilização *in vitro* (FIV)**

247 Para FIV, os ovócitos foram separados de acordo com sua qualidade (I e II; III) e seu tratamento
248 específico, lavados e transferidos para gotas de 200 µl de meio de fecundação. O meio utilizado
249 foi o TALP [18] suplementado com 21,1 µM de penicilina (Sigma®), 10,4 µM de hipo taurina
250 (Sigma®), 1 µM de epinefrina (Sigma®) e 10 µg/ml de heparina (Sigma®).

251 Para cada sessão de PF e, conseqüentemente, cada FIV foram utilizadas doses de sêmen do
252 mesmo reprodutor e da mesma partida. A seleção espermática foi realizada pelo método do
253 gradiente de *Percoll* consistindo de 2 ml de *Percoll* 45% e 2 ml de *Percoll* 90% [18]. O
254 descongelamento do sêmen foi realizado em banho-maria a 36°C. O sêmen foi depositado sobre
255 o gradiente de *Percoll* previamente preparado e centrifugado a 700 giros por 20 minutos à 30°C.
256 Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado permanecendo apenas o *pellet*. Para lavagem
257 do *pellet*, o mesmo era ressuscitado com 2 ml de TALP-sp e novamente centrifugado à 700
258 giros por 5 minutos à 30° C, sendo então ressuscitado em meio de fecundação. Após a
259 avaliação da concentração, o sêmen era adicionado à gota de fecundação em uma concentração
260 final de 1 x 10⁶ espermatozóides/ml.

261 Os ovócitos e os espermatozóides eram co-incubados por 22 horas em estufa a 39°C e 5% de
262 CO₂ em ar, sendo o dia da fecundação considerado o dia 0 (D0).

263 Após a co-incubação, os possíveis zigotos eram retirados da gota de fecundação e lavados em
264 meio de cultivo fluído sintético do oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não
265 essenciais (SOFaa).

266 **2.4.3. Cultivo *in vitro* dos embriões**

267 Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio SOFaa, 0,34 mM de sodium tri citrato (Sigma[®]), 2,77
268 mM myo-inositol (Sigma[®]) e 5% de soro fetal bovino (SFB) [19]. As placas de cultivo foram
269 preparadas um dia antes da sua utilização.

270 Os embriões foram avaliados em D2 para determinar a taxa de clivagem e em D6 e D7 para
271 avaliar a taxa de produção de blastocistos.

272 **2.5. Análise estatística**

273 Foram utilizados modelos de análise de variância. As variáveis dependentes analisadas foram:
274 número de punções, número total de folículos, número de folículos pequenos, número de
275 folículos médios, número de folículos grandes, número total de ovócitos, número de ovócitos de
276 qualidade I e II, número de ovócitos de qualidade III e IV, número de estruturas clivadas e
277 número de embriões. As variáveis independentes foram: coleta, vaca e tratamento, sendo que o
278 efeito da vaca foi avaliado em cada tratamento. A comparação das médias para as variáveis
279 dependentes foi feita pelo método dos Quadrados Médios Mínimos (*Least Square Means*).
280 Todas as análises foram feitas através do procedimento GLM (*General Linear Models*) do
281 SAS[®] [20].

282 **3. Resultados**

283 Um total de 702 folículos foram puncionados durante as 6 sessões de PF realizadas no
284 experimento, sendo registrado 271, 253 e 178 folículos para o G1, G2 e G3, respectivamente. A
285 taxa de recuperação ovocitária média foi de 60,11%. Foram recuperados um total de 422
286 ovócitos dos 3 tratamentos, sendo que, 296 CCOs foram selecionados para MIV. Do total de
287 ovócitos recuperados 165 foram do G1, 174 do G2 e apenas 83 do G3, sendo que foram
288 submetidos à MIV, 117, 119 e 60, para o G1, G2 e G3, respectivamente.

289 A taxa de clivagem foi de 62,16% (184) do total de CCOs submetidos à FIV (296), com um
290 número total de blastocistos de 20,60% (61).

291 Foi observado um aumento ($p<0,01$) na média de folículos pequenos, com diâmetro de até 5
292 mm, no G1 (9,44) e G2 (9,44) em relação ao G3 (6,12). Já para o número de folículos entre 5 e
293 10 mm e maiores que 10 mm, não foi detectada diferença ($p>0,05$).

294 A média de folículos totais por vaca por punção foi de 10,84, 10,12 e 7,12 para o G1, G2 e G3,
295 respectivamente, sendo que o G1 e G2 não diferiram ($p>0,05$) entre si apresentando, porém,
296 uma média superior ($p<0,0001$) de folículos em relação ao G3 (Tabela 1).

297 A média de ovócitos coletados/vaca/punção foi superior ($p<0,01$) no G1 (6,56) e no G2 (6,96)
298 em relação ao G3 (3,36) (Tabela 1).

299 A taxa de recuperação ovocitária, ou seja, número de ovócitos coletados/número de folículos
300 disponíveis foi de 60,51%, 68,77% e 47,19%, para o G1, G2 e G3, respectivamente (Tabela 2).

301 Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de recuperação entre o G1 e G2 e entre o G1 e o G3,
302 porém, houve, entre o G2 e G3 ($p<0,05$). A taxa de recuperação foi influenciada pelo fator
303 individual do animal, pelo tratamento e pela coleta ($p<0,05$).

304 Em relação à qualidade dos CCO's foi registrada diferença ($p<0,05$) na média de ovócitos de
305 qualidade I e II por punção entre os grupos, sendo $13\pm0,5$ para G1, $5,6\pm0,5$ para o G2 e $2,6\pm0,5$
306 para o G3. Para ovócitos de qualidade III e IV observou-se uma maior ($p<0,05$) recuperação de
307 ovócitos no G2 ($5,84\pm2,77$) quando comparado ao G1 ($3,96\pm2,77$) e ao G3 ($3,08\pm2,77$). Porém
308 não foi observada diferença ($p>0,05$) entre o G1 e o G3.

309 Foi registrado diferença ($p<0,05$) na taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade I e II entre o
310 G1 e os demais grupos, não havendo diferença ($p>0,05$) do G2 para o G3, sendo de 80%
311 ($10,4\pm2$), 75% ($4,2\pm2$) e 61,5% ($1,6\pm2$), respectivamente (Tabela 3). Não houve diferença
312 ($p>0,05$) na taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade III entre os grupos, sendo de 52%
313 ($5,4\pm1,87$), 59,3% ($10,8\pm1,87$) e 47% ($4,4\pm1,87$), para o G1, G2 e G3, respectivamente (tabela
314 3). Já a taxa de clivagem total foi maior ($p<0,05$) para o G1, 67,5% ($15,8\pm2,39$) e G2, 63%
315 ($15\pm2,39$), em relação ao G3, 50% ($6\pm2,39$). Sendo que não houve diferença ($p>0,05$) entre o
316 G1 e G2.

317 Foi registrado um aumento ($p<0,05$) na taxa de blastocistos oriundos de ovócitos de qualidade I
318 e II apenas do G1 para o G3, 46,15% ($6\pm2,03$) e 15,38% ($0,4\pm2,03$), respectivamente. Sendo
319 que o G2 não apresentou diferença ($p>0,05$), 32,14% ($1,8\pm2,03$), dos demais grupos. Sendo que,
320 em relação a taxa de blastocistos de ovócitos de qualidade III, não houve diferença entre os

321 grupos ($p>0,05$), sendo de 6% ($0,6\pm0,88$), 11% ($2\pm0,88$) e 15% ($1,4\pm0,88$), para o G1, G2 e G3,
322 respectivamente (Tabela 3).

323 Não foi detectada diferença ($p>0,05$) na taxa total de blastocistos entre os grupos G1, G2 e G3,
324 sendo: 28,20% ($6,6\pm2,15$), 16% ($3,8\pm2,15$) e 15% ($1,8\pm2,15$), respectivamente.

325 **4. Discussão**

326 O aumento no número de folículos pequenos, até 5 mm, assim como o aumento no número total
327 de folículos, registrados no G1 e G2, estão de acordo com os registrados por Campos [21] que
328 utilizando somente PGF2, a cada 10 dias, em vacas doadoras de ovócitos, registrou uma média
329 de folículos por vaca/punção de 6,28. Também descreve, como neste estudo, um menor número
330 de folículos em relação aos grupos tratados. Porém, o tratamento utilizado nas vacas proposto
331 por Campos [21], utilizava GnRH e bST, considerado grupo com alta P4, apresentou média de
332 folículos puncionados igual ao G1 deste experimento (10,84). A média de folículos/vaca/PF
333 também concordam com os resultados registrados por Petyim *et al.* [12] que trabalhando com
334 um grupo de doadoras de ovócitos que foram puncionadas 2 vezes por semana, registraram uma
335 média de folículos de $6,6\pm2,9$ /punção/vaca.

336 A média superior de ovócitos coletados/vaca/punção do G1 e G2 para o G3, assim como o
337 aumento dos ovócitos coletados em sessões de PF registrados por Campos [21] indicam que a
338 presença de diferentes níveis de progesterona pode influenciar na foliculogênese, o que pode ser
339 observado através da diferença no número de folículos registrados nas vacas que receberam P4
340 em relação às vacas do G3, as quais, provavelmente, apresentavam baixos ou até mesmo níveis
341 plasmáticos não detectáveis de P4. O fato da progesterona determinar uma pulsatilidade de LH
342 de baixa frequência [22], de acordo com o recrutamento folicular apresentado nas vacas que
343 receberam CIDR[®], indica que os folículos podem estar somente sob ação do FSH. O mecanismo
344 de estímulo de pequenos folículos antrais ainda não é bem conhecido [23, 24], sendo que a
345 maioria dos folículos que se apresentavam no momento das PFs eram de folículos antrais
346 menores que 5 mm, os quais possuem pouca influência das gonadotrofinas.

347 Como o estradiol e a inibina são os principais hormônios envolvidos na atresia folicular [25],
348 uma redução dos pulsos de LH, poderia estar influenciando a esteroidogênese dos folículos em

desenvolvimento [26, 27], pois o LH atua como precursor dos esteróides, como o estradiol [28].

Desta forma afetando a taxa de atresia folicular, o que pode explicar o maior número de folículos disponíveis nos grupo tratados com P4. Os níveis de estradiol e inibina podem ter se apresentados baixos nestes grupos (G1 e G2), pois nos exames ultra-sonográficos realizados no momento das PFs, foram diagnosticados um grande número de folículos pequenos de mesmo diâmetro sem dominância entre estes. O fato das punções ocorrerem a cada 4 dias poderia estar relacionada com a baixa taxa de atresia [10], mas o G3, composto por vacas que não haviam sido submetidas à P4 exógena, apresentou uma disposição de folículos menor do que os grupos que utilizavam P4 exógena. Portanto, é possível inferir que no presente estudo o desenvolvimento folicular foi mais influenciado pela possível baixa pulsatilidade do LH do que pelo intervalo entre as punções.

A diferença registrada na taxa de recuperação entre o G2 e o G3, demonstra que o grupo tratado com 2 CIDR[®]s (G2) apresentou maior taxa de recuperação do que o grupo que não sofreu influência da progesterona (G3). Isto pode estar ligado ao fato de que apresentavam maior população folicular, facilitando assim a obtenção dos ovócitos. Estes resultados concordam com o trabalho de Petyim *et al.* [12] que trabalhou com 2 esquemas de PF diferentes, sendo um contínuo (2 sessões por semana) e outro descontínuo (sessões restritas aos dias 0 a 12 do ciclo estral). Neste estudo mesmo que no método descontínuo tenha sido observado um maior número de folículos, a taxa de recuperação foi de 58,5%, enquanto que no método contínuo, a disposição folicular foi menor, com taxa de 45,6%. A mesma relação folículos:CCOs não foi registrada por Pivato [29], que relatou taxa de recuperação maior em vacas que apresentavam menor disponibilidade folicular.

Foi registrada neste experimento uma diferença na média de ovócitos de qualidade I e II entre o grupo que recebeu implante de progesterona reutilizado e o grupo que não recebeu progesterona. Estes resultados indicam que a progesterona tem influência na média de ovócitos obtidos de qualidade I e II.

A partir destes resultados é possível inferir sobre a existência de um nível de P4 adequado, capaz de influenciar a qualidade ovocitária mesmo que de forma indireta. Este fato pode estar

relacionado com a frequência dos pulsos de LH e dos níveis de atresia de cada tratamento. O G1, possivelmente, apresenta um padrão pulsátil de LH maior do que o G2, indicando uma moderada atresia causada por estes pulsos de LH. Este aspecto é discutido por alguns estudos [30, 31] que sugerem melhoria da competência ovocitária em função de um baixo nível de atresia. Greve *et al.* [32] mencionam que a progesterona permite que o folículo seja exposto por um maior período a pequenos pulsos de LH podendo melhorar a qualidade ovocitária. O aumento da recuperação de ovócitos de qualidade I e II registrados no presente experimento, no grupo tratado com P4 não foi observado por Wit *et al.* [3] que trabalharam com ovócitos recuperados de ovários de abatedouro avaliando a qualidade em diferentes estágios do ciclo estral. Neste trabalho não foi registrado diferença na qualidade entre ovócitos coletados na fase luteal recente (de 0 a 7 dias do ciclo) e de ovócitos coletados na fase luteal tardia (de 8 a 17 dias do ciclo estral). Sartori *et al.* [33], registraram níveis de P4 em vacas leiteiras de até 2 ng/ml na fase luteal precoce e de 4,2 ng/ml na fase luteal tardia. Porém, Vassena *et al.*, [34] registraram um aumento na qualidade dos ovócitos quando estes foram recuperados no dia 5 do ciclo estral, após a emergência da onda folicular. Este momento corresponde ao estágio de desenvolvimento no qual a maioria dos folículos subordinados estão na fase estática tardia ou na fase de atresia recente [1]. O aumento da qualidade dos ovócitos no grupo tratado com 1 CIDR[®] reutilizado também não concorda com os registros de Campos [21], que utilizando GnRH e bST no tratamento de vacas submetidas à PF, em animais que haviam sido superovulados, o qual chamou de grupo com alta P4, não obteve diferença na qualidade dos CCO's do grupo controle com baixa P4, para as qualidades I e II, ambos com 33%. O tratamento usado por Campos [21] no grupo controle foi o mesmo utilizado no G3 deste experimento. Os resultados encontrados no presente experimento discordam, em parte, com os resultados registrados por Viana *et al.* [35] que trabalharam com 3 grupos de animais da raça Gir, utilizando Crestar[®], como fonte de progesterona, trocado a cada 14 dias. Neste estudo foi registrado um aumento no número de ovócitos de qualidade I do grupo tratado com FSH do que o grupo tratado somente com progestágeno. Estes resultados sugerem que animais tratados com FSH têm um aumento na disponibilidade de folículos maiores, desta forma, facilitando o fluxo laminar no momento da

405 coleta pelo aumento do líquido folicular e por apresentar menores níveis de atresia do que o
406 grupo tratado apenas com progestágeno. Wit *et al.* [3] não relacionam a atresia como promotor
407 da diminuição da qualidade ovocitária, pois há uma relação de atresia recente com o aumento na
408 qualidade dos ovócitos. Assim, caberia avaliar quais são os níveis de atresia que são prejudiciais
409 ou benéficos para a qualidade ovocitária. Segundo, Vassena *et al.* [34], folículos com mesmo
410 diâmetro podem se encontrar em fases fisiológicas diferentes, sendo que também constatou uma
411 correlação positiva entre a regressão folicular recente e a competência ovocitária.

412 Neste estudo como, provavelmente, o G1 possui menor concentração de P4 que o G2, as vacas
413 do G1 podem apresentar maior frequência de pulsos de LH do que vacas do G2. Como LH é
414 precursor do estradiol, os níveis de atresia no G1 podem ter sido maiores que no G2, o que
415 promoveu um aumento da qualidade dos ovócitos. Estes resultados sugerem que os folículos
416 dos animais dos três grupos utilizados neste experimento foram submetidos à diferentes níveis
417 de atresia.

418 A maior média de ovócitos de qualidade III e IV registrado no G2, possivelmente está mais
419 relacionada com o número superior de ovócitos recuperados neste grupo do que propriamente
420 em função de um efeito direto da progesterona na qualidade destes ovócitos.

421 O aumento na taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade I e II, registrado no G1 em relação ao
422 G2 e G3, assim como, a diferença na taxa de clivagem total registrada entre os grupos tratados
423 com progesterona (G1 e G2) em relação ao G3, indica que os tratamentos influenciaram
424 positivamente na taxa de clivagem, pois os grupos que receberam implante de progesterona
425 apresentaram melhor taxa de clivagem que o G3. O mecanismo fisiológico envolvido neste
426 processo é sustentado pela hipótese de Assey *et al.* [36], indicando que os sinais de atresia que
427 um ovócito pode apresentar está relacionado com uma degeneração folicular, a qual conduz à
428 uma diminuição na concentração de estradiol 17- β e testosterona [37]. Esta condição se dá em
429 função de uma redução da atividade da desmolase e aromatase [38]. Estas mudanças se
430 assemelham as que ocorrem após o pico de LH podendo, portanto, influenciar no potencial de
431 desenvolvimento de ovócitos imaturos.

Os resultados registrados na taxa de produção de blastocistos concordam, em parte, com os achados por Wit *et al.* [3], que registraram diferenças na taxa de blastocistos de ovócitos oriundos de abatedouro de qualidades A, B e C (de acordo com sua escala de avaliação morfológica em diferentes estágios do ciclo estral), indicando que ovócitos de qualidade B na fase folicular são mais eficientes na produção de embriões do que os ovócitos de qualidade A e C, porém não registrou nenhuma diferença quando todos blastocistos foram comparados de acordo com seu grupo, não interessando a qualidade ovocitária do qual originaram estes embriões. Um suporte para esta hipótese é que os ovócitos de qualidade B estão mais avançados na meiose do que os da qualidade A [36], sendo que esta hipótese pode estar relacionada com os ovócitos recuperados do G1 deste experimento, os quais eram de melhor qualidade, porém não apresentaram diferenças em relação aos demais grupos na taxa de formação de blastocistos. Resultados registrados por Bols *et al.* [39], trabalhando com vacas holandesas, comparou os níveis de progesterona entre 2 grupos de animais, um tratados com bST semanalmente e outro, controle, recebendo somente placebo. Foi detectado em ambos os grupos uma média de níveis de progesterona de > 2 ng/ml, não observando diferença na taxa de blastocistos entre os 2 grupos, 22% e 25%, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente trabalho, pois não houve diferença na taxa de blastocistos entre os grupos tratados com progesterona e o G3.

A partir destes resultados foi possível verificar que vacas tratadas com implantes de progesterona apresentam aumento da quantidade de ovócitos, bem como a disponibilidade de folículos aptos à punção. A qualidade dos ovócitos de qualidade I e II recuperados e a taxa de produção de blastocistos oriundos de ovócitos de qualidade I e II foram maiores quando as doadoras eram submetidas a apenas 1 CIDR[®] reutilizado em relação à vacas que não receberam implantes, além de aumentar a taxa de clivagem de ovócitos de qualidade I e II em relação aos demais tratamentos. A taxa de clivagem total foi maior quando as vacas foram submetidas à tratamentos com progesterona, porém não houve diferença na taxa de blastocistos total entre os grupos.

458 **5. Referências bibliográficas**

- 459 [1] ADAMS, GP Comparative pattern of follicle development and selection in ruminants. J
460 Reprod Fertil Suppl 1999; 54:17–32.
- 461 [2] BOUSQUET, D, TWAGIRAMUNGU, H, MORIN, N, BRISSON, C, CARBONEAU, G,
462 DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the
463 conventional embryo production approach. Theriogenology 1999; 51: 59-70.
- 464 [3] WIT, AAC., WURTH, YA, KRUIP, ThAM. Effect of ovarian phase and follicle quality on
465 morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J Anim Sci
466 2000; 78: 1277-1283.
- 467 [4] BLONDIN, P, SIRARD, A. Oocyte and follicular morfology as determining characteristics
468 for developmental comportance in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 41,54-62.
- 469 [5] LEIBFRIED-RUTLEDGE, ML, CRITSER, WH, EYESTONE, DL, FIRST, NL.
470 Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. Biol Reprod 1987; 36:
471 376-383.
- 472 [6] VAN SOOM A, KRUIF A DE. Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation
473 development in the bovine: implications for in vitro production of embryos. Reprod Dom Anim
474 1996, 31: 687-701.
- 475 [7] MACMILLAN, KL, TAUFA, VK, HAYMAN, DL. Pregnancy rates in lacting dairy cows
476 used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving supplemental progesterone. New
477 Zealand Embryo Transfer Workshop, Hamilton, NZ, 1994. p. 34-35.
- 478 [8] BÓ, GA, TRÍBULO, H, CACCIA, M, TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients
479 treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection.
480 Theriogenology 2001; v. 55, p. 357 (abstr).
- 481 [9] NASSER, LF, BO, GA, MARQUES, MO, MAPLETOFT, RJ, BARUSELLI, PS.
482 Superovulatory response during the first follicular wave in nelore (Bos Indicus) Donors
483 Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil 2002; v. 29 (Suppl.), p. 337
484 (abstr.).

- 485 [10] GIBBONS, JR, WILTBANK, MC, GINTHER, OJ. Relationship between follicular
486 development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. Biol Reprod .
487 1999; 60, 72–77.
- 488 [11] PFEIFER, LFM, CORRÊA, MC, RABASSA, VR, SCHNEIDER, A, LUZ, EM. Avaliação
489 dos níveis de progesterona plasmática com o uso de CIDR® em novilhas leiteiras. In: XVI
490 Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2004, Passo Fundo – RS 2004; XVI Congresso
491 Estadual de Medicina Veterinária.
- 492 [12] PETYIM, S, BAGE, R, HALLAP, T, BERGQVIST, AS, RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H,
493 LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effects
494 on oocyte recovery and ovarian function. Theriogenology 2003; 60. 175-188.
- 495 [13] LEIBFRIED-RUTLEDGE, ML, FIRST, NL. Characterization of bovine follicular oocytes
496 and their ability to mature in vitro. J Anim Sci 1979; 48, 76-86.
- 497 [14] CROSBY, IM, OSBORN, JC, MOOR, RM. Follicle cell regulation of protein synthesis
498 and developmental competence in sheep oocytes. J Reprod Fertil 1981; 62:575–582.
- 499 [15] FUKUI, Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and
500 developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. Mol Reprod Dev 1990; 26:40–
501 46.
- 502 [16] STAIGMILLER, RB, MOOR, RM. Effect of follicle cells on the maturation and
503 developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res 1984;
504 9:221–229.
- 505 [17] DODE, MAN, RODOVALHO, NC, UENO, VG, FERNANDES, CE. The effect of sperm
506 preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. Anim Reprod
507 Sci 2002; 69. 15–23.
- 508 [18] PARRISH, JJ, SUSKO-PARRISH, JL, KROGENAES, A. Effect of bovine sperm
509 separation by either swin-up or percool method on success of in vitro fertilization and early
510 embryonic development. Theriogenology 1995; 44. 859-869.
- 511 [19] HOLM, P, BOOTH, PJ, SCHMIDT MH, GREVE, T, CALLESEN, H. High bovine
512 blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium

- 513 supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.
 514 Theriogenolgy 1995; 52, 859-869.
- 515 [20] SAS®. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1991.
- 516 [21] CAMPOS, HCF. Avaliação do efeito residual da superovulação sobre a produção *in vitro*
 517 de embriões em sessões de punção folicular subseqüentes. Tese. Reprodução Animal.
 518 Universidade de Brasília 2004, 55p. Brasília, DF.
- 519 [22] RAHE, CH., OWENS, RE., FLEEGER, JL., NEWTON, HJ. HARMS, PG. Pattern of
 520 plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle.
 521 Endocrinology 1980; 107: 498-503.
- 522 [23] CUSHMAN, RA, DESOUZA, JC, HEDGPETH, VS., BRITT, JH. Alteration of activation,
 523 growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol
 524 and recombinant bovine somatotropin. Biol Reprod 2001; 65, 581–586.
- 525 [24] ROTH, Z, ARAV, A, BOR, A, ZERON, Y, BRAW-TAL, R, WOLFENSON, D.
 526 Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired
 527 follicles from previously heat-stressed cows. Reproduction 2001; 122, 737–744.
- 528 [25] MIHM, M, KHAN, A, BLEACH, E, KNIGHT, PG. Health and atresia in first wave
 529 follicles is reflected in changing serum dimeric inhibin-A concentrations in dairy heifers. Mol
 530 Cell Endocr 2001; 180, 200 (abstract).
- 531 [26] COOKE, DJ, CROWE, MA, ROCHE, JF. Circulating FSH isoform patterns during
 532 recurrent increases in FSH throughout the oestrous cycle of heifers. J Reprod Fert 1997; 110,
 533 339–345.
- 534 [27] CROWE, MA, PADMANABHAN, V, MIHM, M, BEITINS, IZ, ROCHE, JF. Resumption
 535 of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-
 536 stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and gonadotropin
 537 concentrations. Biol Reprod 1998; 58, 1445–1450.
- 538 [28] AUSTIN, EJ, MIHM, M, EVANS, ACO, KNIGHT, PG, IRELAND, JLH, IRELAND, JJ,
 539 ROCHE, JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of
 540 follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. Biol Reprod 2001; 64, 839–848.

- 541 [29] PIVATO, I. Efeito de diferentes tratamentos hormonais e da nutrição em doadoras de
542 ovócitos na produção de embriões bovinos *in vitro*. Tese. Reprodução animal. Universidade
543 Federal de Pelotas 2001, 62 p. Pelotas.
- 544 [30] MATTON, P, ADELAOUN, V, COUTURE, Y, DUFOUR, JJ. Growth and replacement
545 of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. J Anim Sci 1981; 37, 48–53.
- 546 [31] CAMPBELL, BK, PICTON, HM, MANN, GE, MCNEILLY, AS, BAIRD, DT. Effect of
547 steroid- and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone
548 secretion. J Reprod Fert 1991; 93, 81–96.
- 549 [32] GREVE T, HYTTEL P, ASSEY R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and
550 embryo quality in cattle. Theriogenology 1995; 43: 41-50.
- 551 [33] SARTORI, R; HAUGHIAN, JM; SHAVER, RD; ROSA, GJM.; WILTBANK, MC.
552 Comparison of ovarian function and circulatingsteroids in estrous cycles of holstein heifers and
553 lactating cows. J Dairy Science 2004; 87: 905-920.
- 554 [34] VASSENA, R, MAPLETOFT, RJ, ALLODI, S, SINGH, J, ADAMS, GP. Morphology and
555 developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. Theriogenology 2003;
556 60: 923–932.
- 557 [35] VIANA, JHM, FERREIRA, AM, CAMARGO, LSA. Effect of ovarian pre-stimulation on
558 the ultrasound-guided follicular puncture. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2003; vol.55, no.1,
559 p.68-74. ISSN 0102-0935.
- 560 [36] ASSEY, RJ, HYTTEL, P, GREVE, T, PURWANTARA, B. Oocyte morphology in
561 dominant and subordinate follicles. Mol Reprod Dev 1994; 37, 335–344.
- 562 [37] KRUIP, TAM; DIELEMAN, SJ. Intrinsic and extrinsic factors influencing steroid
563 production in vitro by bovine follicles. Theriogenology 1989; 31:531–544.
- 564 [38] KRUIP, TAM; DIELEMAN, SJ. Macroscopic classification of bovine follicles and its
565 validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. Reprod Nutr Dev 1982;
566 22:465–473.

567 [39] BOLS, PEJ, YSEBAERT, MT, LEIN, A, CORYN, M, VAN SOOM, A, KRUIF, A.
568 Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent
569 oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF Program. Theriogenology 1998; 49: 983-995.

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595 Tabela 1: Média de folículos e ovócitos/animal/sessão de acordo com o tratamento de cada
596 grupo experimental.

Grupo	Folículos/animal/sessão	Ovócitos/animal/sessão
1- CIDR reutilizado	10,84 ^A	6,56 ^a
2- CIDRs novos	10,12 ^A	6,96 ^a
3- sem P4	7,12 ^B	3,36 ^b

597 Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,0001$).

598 Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,01$).

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618 Tabela 2: Número de folículos puncionados e taxa de recuperação de acordo com o tratamento
 619 de cada grupo experimental.

Grupo	Folículos puncionados	Taxa de Recuperação (%)
1- CIDR reutilizado	271	60,51 ^{AB}
2- CIDRs novos	253	68,77 ^A
3- sem P4	178	47,19 ^B
Total	702	60,11

620 Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640 Tabela 3: Médias ($\pm$ desvio padrão) e frequências (%) de clivagem e de blastocistos por
 641 qualidade ovocitária de acordo com o tratamento de cada grupo experimental em cada punção
 642 folicular.

Grupo	Clivagem			Blastocistos		
	Qualidade ovocitária		Clivagem	Qualidade ovocitária		Blastocistos
	I-II	III		I-II	III	
	(%)*	(%)*	(%)*	(%)*	(%)	(%)
1- CIDR	10,4 $\pm$ 2 ^b	5,4 $\pm$ 1,87 ^{ab}	15,8 $\pm$ 2,39 ^a	6 $\pm$ 2,03 ^{ab}	0,6 $\pm$ 0,88	6,6 $\pm$ 2,15
reutilizado	(80)	(52)	(67,5)	(46,15)	(6)	(28,2)
2- CIDRs	4,2 $\pm$ 2 ^{bc}	10,8 $\pm$ 1,87 ^a	15 $\pm$ 2,39 ^a	1,8 $\pm$ 2,03 ^b	2 $\pm$ 0,88	3,8 $\pm$ 2,15
novos	(75)	(59,3)	(63)	(32,14)	(11)	(16)
3- sem P4	1,6 $\pm$ 2 ^c	4,4 $\pm$ 1,87 ^b	6 $\pm$ 2,39 ^b	0,4 $\pm$ 2,03 ^b	1,4 $\pm$ 0,88	1,8 $\pm$ 2,15
	(61,5)	(47)	(50)	(15,38)	(15)	(15)

643 *p < 0,05

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658 Figure 1 – Hormonal and punction protocol, L. F. Pfeifer.

659 FIGURA 1: Protocolos hormonais e de PF utilizados no experimento.

660 **Legenda:**

661 PGF2: aplicação de 0,150 mg de D-cloprostenol

662 PF: punção folicular

663 CIDR[®]: período de permanência do dispositivo liberador de progesterona nas doadoras.