



*LINDSAY UNNO GIMENES*

*Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de  
oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em  
diferentes fases da onda de crescimento folicular*

*São Paulo*

*2010*



LINDSAY UNNO GIMENES

**Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de  
oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em  
diferentes fases da onda de crescimento folicular**

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

**Departamento:**  
Reprodução Animal

**Área de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2010

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2340  
FMVZ

Gimenes, Lindsay Unno

Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular / Lindsay Unno Gimenes. -- 2010.

122 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. PIV. 2. OPU. 3. Sincronização da emergência folicular. 4. Grupo genético. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

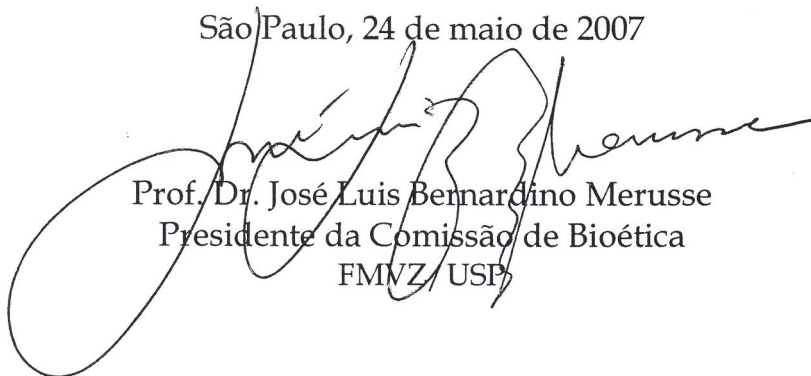
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do período de dominância folicular na taxa de recuperação *in vivo* e na competência do desenvolvimento *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos", protocolado sob o nº1070/2007, utilizando 27 (vinte e sete) animais, sendo 9 (nove) de cada espécie (bubalinos, zebuínos e taurinos), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research "Effect of follicular dominance on recovery rate *in vivo* and on *in vitro* competence of *bubalus bubalis*, *bos indicus* and *bos taurus* oocytes", protocol number 1070/2007, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GIMENES, Lindsay Unno

Título: Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*Aos meus queridos pais DAYTON GIMENES e EMÍLIA SAYURI UNNO GIMENES,*

*Ao meu querido irmão VINÍCIUS UNNO GIMENES*

**DEDICO**

## AGRADEÇO

*Esta Tese não teria sido possível sem a enorme colaboração de inúmeras pessoas, que espero não esquecer de agradecer. Como ouvi algumas vezes durante a execução deste projeto: “pra quem tem o teu tamanho, até que você incomoda bastante!” Esta etapa foi, sem dúvida, um marco na minha vida científica, e sozinha eu realmente não teria conseguido.*

*À Deus, por abrir muitas janelas em minha vida, para que eu tente me tornar uma pessoa melhor a cada dia.*

*Ao meu pai, Dayton Gimenes. Quantas saudades eu tenho de você, paizinho... Sei que você está olhando por nós, e esteja certo de que você foi um dos maiores responsáveis por esta conquista!*

*À minha mãe, Emília Sayuri Unno Gimenes, por estar sempre me apoiando e me impulsionando pra frente nesta jornada.*

*Ao meu “irmãozinho”, Vinícius Unno Gimenes, que com seu companheirismo e paciência torna meus dias melhores.*

*À toda minha família, em especial às tias Célia e Ângela, por me acompanharem desde “pequeninha” sempre comemorando minhas vitórias.*

*Ao Professor Titular Pietro Sampaio Baruselli, por quem minha admiração cresce a cada dia. Me lembro quando cheguei ao VRA pra ver se existiria uma chance de eu ser orientada por ele no Mestrado. Isso não só aconteceu, como continuei no Doutorado! Não tenho palavras pra te agradecer por ser, de fato, um Educador, colaborando na minha formação científica e pessoal.*

*Um agradecimento especial aos professores: Flávio Vieira Meirelles (LMMD-FZEA), entusiasta e grande colaborador neste estudo desde o nosso projeto piloto; Rubens Paes Arruda (CBRA-FMVZ) e Francisco de Palma Rennó (VNP-FMVZ), pela imprescindível ajuda, favorecendo a condução do experimento no campus de Pirassununga; Mário Binelli (CBRA-FMVZ) e Fabíola Paula-Lopes (UNIFESP), pela enorme contribuição quanto à melhoria deste trabalho; e Luzia Aparecida Trinca (IBB-UNESP), Paulo Mazza (VNP-FMVZ) e Júlio Baliero (MGA-FZEA) pelo auxílio na análise estatística, ou simplesmente esclarecendo minhas infinitas dúvidas sobre o tema. Agradeço também aos professores Roberto Sartori e José Buratini Jr. por instigar o espírito científico em cada oportunidade, seja em congressos, defesas ou churrascos.*

*À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, pela amizade, conselhos e ensinamentos: Prof. Renato Campanarut Barnabé, Prof. José Antônio Visintin, Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Prof.*

*Mário Binelli, Prof. Ed Hoffman Madureira, Prof. Rubens Paes de Arruda, Profa. Valquíria Hyppolito Barnabé, Profa. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Profa. Camila Infantsi Vannucchi, Profa. Cláudia Fernandes Barbosa, Profa. Eneiva Carla Celeghini e Profa. Annelise Traldi.*

*Aos companheiros do projeto piloto iniciado na Vitrogen: Yeda Fumie Watanabe, Francisco Mastrângelo Marques Pereira, Márcio Leão Ferraz, Anderson Araújo, Ricardo Garcia de Almeida, Fernando Buseti Ribeiro Dias, Daniel Carlino, Mônica Accorsi, Eva Cristiane, Tatiana Tonello, Ricardo Favati. Pra mim foi um prazer enorme conhecê-los e poder trabalhar com vocês! Agradeço também ao Prof. Guilherme de Paula Nogueira, Maria Paula Beltran e Dê, pelas dosagens hormonais deste período; e aos funcionários da antiga Central da Vitrogen: Leandro, Jair e Ferreirinha, pela ajuda com o manejo dos animais.*

*Ao Dr. Ubiraem Schalch, por intermediar o empréstimo dos animais utilizados no experimento do Doutorado. Às fazendas Santa Adele (Analândia – SP) e São Caetano (Tambaú – SP) pela concessão das novilhas da raça Nelore e Holandesa, sem as quais este estudo não teria sido possível. À PCAPS e aos setores de bubalinocultura e gado de corte, pela concessão das novilhas bubalinas e Nelore.*

*Aos grandes companheiros do projeto de Doutorado: Márcio Leão Ferraz, Anderson Araújo, Paulo Fantinato Neto, Patrícia Helena Miguez, Marcos Roberto Chiaratti, Lígia Garcia Mesquita e Juliano Sangali. Vocês foram fundamentais durante a execução deste estudo! Muito obrigada pela motivação diária e amizade, e por deixarem de lado seus compromissos em meu favor!*

*Aos estagiários Juan Sebastian Pineda Arango, Cindy Libeth Vilanueva, Tassia Gonçalves, Carol Destro, Mariana Raposo, Diego Souza, Gustavo Calomeni, Rodrigo Gardinal, César Caetano, Gabriel Gomes, Natália, Milena, Mineiro, Tito, Peter, Giséle Gregghi, Mariângela Fernanda, André, pela enorme ajuda durante o período experimental.*

*Aos funcionários do Campus Administrativo de Pirassununga: João, Márcio, Zé Maria, D. Edna, Clayton, Carlinhos, Ismael, Paulinho, Roberlei, Ricardo, Pavão (Edgar), Schmidt, Kuel, Prof. Marcelo, Renato, Pavão (Eduardo), Adriana, Fernando Schalch e Fernando.*

*Aos amigos de Pirassununga, por estarem ao meu lado no dia mais difícil da minha vida (e esse agradecimento vale também pros meus queridos amigos de SP: Gabriel, José Nélio e Alê Nicácio), mas principalmente por compartilharem comigo infinitos momentos de diversão: José Rodrigo Valim Pimentel (Zezito), Lígia Garcia Mesquita (Frô), Paulo Fantinato Neto (Pulinho) e Sylvia Cortezzi (Syl). Quero agradecer imensamente pela amizade, risadas e momentos de descontração (geralmente acompanhados de uma cervejinha) a todos do LMMD, do CBRA e agregados: Fabiana Bressan (Martini), Moysés Miranda (Noé), Tiago de Bem, Pedro Ratto (Pedrinho), Paulo Adona (Paul), Juliano Sangali, Rodrigo (de Dracena), Raquel, Mateus, Fernando Delai Pardo (Fernandinho), Raquel Fernandes (Raquelita), Estela Kobashigawa (Estelinha), Fabian Bao (Paraguaio), Andres Mejia,*



Milton Maturana (Mirto), Aline Kehrle (Feiosa!), Patrícia Miguez (Pati), Carol Rocha (Carorrr), André Furugen (Simprão), Juliana Nascimento (Ju), Fabiane Gigli (Bibi), Saara Scolari, Prof. Felipe Perecin, Prof. Heidge Fukumasu, Prof. Luciano Andrade, Prof. Ricardo, Profa. Flávia Verecchia.

Aos amigos “Pietrinhos”: Nélcio Antonio Tonizza de Carvalho (“tranquiilo!”), Everton Luiz Reis (“a primeira Flor Baruseliana do Oriente”), Manoel Francisco de Sá Filho (“Pro aUto, Manoelllll!”), José Ribamar de Souza Torres Júnior (“isso é coisa linda de Deus!”), Henderson Ayres (“obrigado não, ...”), Alexandre Henry de Souza (“nã, nã, não é aí não”), Claudiney Melo Martins (“vamo rachá de ganhá dinheiro!”), Márcio Leão Ferraz (“são 2 folículos medianitos e 1 grandito”), Ana Paula Mantovani (“Arrogante, eu???”), Roberta Machado Ferreira (“Pedrón, por favor, el sol!”), Alessandra Ambrósio Teixeira (“hahahaha, hahahaha!”), Gabriel Crepaldi (“como você não sabe se levar pra casa???”), José Nélio Souza Sales (“é brincadeira...”), Kedson Neves (“meus queridos, venham conhecer as maravilhas do Pará”), Prof. Otávio Jacomini e aos “recém-adquiridos” Laís Vieira (“moço, ela é da Alemanha...”) e Rodrigo Sala (“eu não queria ser repetitivo, mas meu pé tá doendo...”), pelo convívio, pelas discussões científicas e pelas não científicas, e principalmente pelas inúmeras risadas! Por serem companheiros dentro e fora do ambiente de trabalho!

Aos amigos do departamento em São Paulo: Renata, Camilla, Mari Giassetti, Mari Groke, Paulo, Everton, Júlia, Zeca, Flávia, Robinson, Adriano, Weber, Rafaela, Cris, Fernanda, Gisele, Liege, Lilian, Marina, Priscila, Rodrigo, Marcella (Mazão), Marcílio, Paola, Eduardo, Rodrigo, Andressa, Carol, Mari, pela agradável convivência e por formarem a nossa família VRA.

Às amigas Alê Nicácio, Rê Simões, Cris Lúcio, Mari Giassetti, Júlia Baldrighi, Alê Teixeira e Robertinha por me proporcionarem diversão diária, além de serem minhas companheiras de viagens e minhas “conselheiras”.

À secretária de pós-graduação Harumi Shiraishi pela enorme eficiência, competência e por sempre responder às minhas incontáveis dúvidas.

Às secretárias Thaís Soto pela dedicação e solicitude, Maria Alice Machado e Anderson pelos favores prestados.

Aos demais funcionários do VRA, em especial à Dona Sílvia pela enorme simpatia e Sandra pela tranquilidade que compartilham conosco todos os dias, e também ao Miguel, Maria Amélia, Irailton, Luís e Belau pela dedicação aos seus trabalhos.

À bibliotecária Elza Faquim, pelas orientações na redação deste trabalho dentro das instruções normativas.

Às secretárias de pós-graduação pelos favores prestados.

*À Biogenesis-Bagó, em especial ao Reuel Luís Gonçalves, pela doação dos hormônios para o experimento piloto conduzido em Cravinhos; à Tortuga Cia Zootécnica, em especial à Fernanda Altieri e ao Juliano Sabella, pela doação do sal mineral utilizado durante todo o período experimental em Pirassununga, e à Intervet Schering-Plough, em especial ao Juliano Kummer, pela doação dos hormônios utilizados no experimento piloto executado em Pirassununga.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo indispensável suporte financeiro concedido através de bolsa de Doutorado (Processo: 06/59550-6) e de Auxílio Financeiro (Processo: 07/04782-2).*

*Ao lugar onde tudo começou: Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - UNESP - Botucatu. Não posso nunca deixar de agradecer aos professores Prof. Dr. Cezinande de Meira, Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba, Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopez, Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, por toda a orientação, incentivo e apoio que sempre me dedicaram.*

*Ao Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, meu orientador durante a Graduação e a Residência, e que colaborou de maneira fundamental na minha formação científica e como pessoa. Você me deu as primeiras ferramentas pra que eu começasse a caminhar sozinha dentro do meio acadêmico!*

*Aos meus eternos amigos do período de Residência, Carlinha F. Moya, Karina Alberti, Camila de P. Freitas, Gustavo, Alexandre, Zé Del'Acqua, Letícia, Bigu, Lú Leal, Ian, Cely, Cris (Purg's), Brunna, Maria Júlia (Mutuká), Júlio, Eric, Zé, Marcela, Zé (Corvo), Youko (Arru), Hugo (Long), Raquel (Mety), Ju, Daniela (Xi), Paulo Vinícius (Pankeka), Andressa (Pepéia), Paula, Ricardo (Xicá), Fabiano (Lambi), Marúcio, Thaísa, Sílvio e Gi, por terem tornado aquele o melhor ano da minha vida!*

*À Madi, Carol e Gabi pelo companheirismo e amizade duradoura, apesar do tempo e da distância.*

*À XXXV, pelas saudades que tenho daquela época!*

*Às pessoas que colaboraram de alguma forma no decorrer deste projeto, e que porventura eu tenha esquecido...*

*À todos, muito obrigada!!!*

*“Tente mover o mundo. O primeiro passo será mover a si mesmo”*

*Platão*

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

GIMENES, L. U. **Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular.** [*In vivo* recovery rate and *in vitro* competence of *Bubalus bubalis*, *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes obtained at different phases of follicular wave]. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo do presente estudo foi o de determinar em qual fase da onda de crescimento folicular são obtidas maiores taxas de recuperação e competência de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU) em novilhas cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*; Capítulo 1) ou em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*), zebuínas (Nelore; *Bos indicus*) e taurinas (Holandês; *Bos taurus*; Capítulo 2). No Capítulo 1, 30 novilhas cruzadas foram submetidas à OPU aos 2 (D2), 4 (D4) e 6 (D6) dias após a emergência da onda de crescimento folicular (n=10/ grupo), em delineamento “cross-over” realizado em 3 réplicas. Os oócitos recuperados foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos de produção *in vitro*. Os dados foram analisados por ANOVA, utilizando o PROC MIXED, considerando os efeitos fixos de momento de OPU, de réplica e da interação entre eles, e o efeito aleatório de doadora. Foram produzidos maior taxa de blastocistos aos 6 dias pós-FIV, bem como maior número de blastocistos aos 9 dias pós-FIV e maior número de núcleos dos embriões eclodidos quando procedeu-se com aspiração no D2. Contudo, a OPU realizada no D6 também influenciou positivamente a taxa de blastocistos 6 dias pós FIV e não diferiu dos outros momentos com relação ao número de núcleos dos embriões eclodidos. No Capítulo 2, foram realizados 2 experimentos (1 e 2). No Experimento 1, foi avaliado o efeito de 50 mg de progesterona injetável na sincronização de emergência folicular em novilhas Nelore, Holandesas e bubalinas submetidas a protocolo de sincronização à base de progestágeno associado a 2 mg de benzoato de estradiol (n=10/ grupo). Os dados foram analisados por regressão logística, utilizando o PROC GLIMMIX. O momento da emergência folicular não foi afetado pela administração de progesterona injetável, ocorrendo entre 4,2 a 4,5 dias após o início do protocolo de sincronização para os três grupos genéticos. No Experimento 2, foram avaliados os efeitos de momento de sincronização da emergência folicular para a aspiração folicular (1, 3 ou 5 dias após a emergência) e de grupo genético (Nelore, Holandês e búfalo) na produção de embriões *in vitro*. Um

total de 27 novilhas (9 de cada grupo genético, subdivididas nos 3 momentos de aspiração folicular) foram submetidas a 6 sessões de OPU, em delineamento “cross-over”. Os oócitos recuperados foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos de produção *in vitro*. Os dados foram analisados por ANOVA, utilizando o PROC MIXED, considerando os efeitos fixos de momento de OPU, de grupo genético, de réplica e da interação entre eles, e o efeito aleatório de doadora. Os resultados demonstraram que novilhas Nelore apresentaram melhor eficiência para a produção de embriões *in vitro* do que as novilhas Holandesas ou bubalinas, e que a aspiração folicular realizada em diferentes momentos da onda folicular sincronizada não influenciou a produção *in vitro*.

Palavras-chave: PIV. OPU. Sincronização da emergência folicular. Grupo genético.

## ABSTRACT

GIMENES, L. U. ***In vivo* recovery rate and *in vitro* competence of *Bubalus bubalis*, *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes obtained at different phases of follicular wave.** [Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular]. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The objective of the present study was to determine in which phase of follicular wave higher recovery rates and better oocyte competence can be obtained by ovum pickup (OPU) in crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*; Chapter 1) or buffalo (*Bubalus bubalis*), Nelore (*Bos indicus*) and Holstein heifers (*Bos taurus*; Chapter 2). In Chapter 1, 30 crossbred heifers were submitted to OPU on days 2 (D2), 4 (D4) or 6 (D6) after follicular wave emergence (n=10/ group), in a cross-over design performed in 3 replicates. Oocytes recovered were selected and those viable were submitted to *in vitro* embryo procedures. Data were analyzed by ANOVA, using PROC MIXED, in which time of OPU, replicate and interaction between these factors were considered as fixed effects, and donor was considered as a random effect. Higher blastocyst rate (6 days after IVF), number of blastocysts (9 days after IVF), and number of nuclei of hatched embryos were produced when OPU was done on D2. However, OPU on D6 also produced a higher blastocyst rate (6 days after IVF), and did not differ from other times of OPU concerning number of nuclei of hatched embryos. In Chapter 2, two experiments were performed. In Experiment 1, the effect of 50 mg of injectable progesterone was evaluated in the synchronization of follicular wave emergence of Nelore, Holstein, and buffalo heifers submitted to a progestin plus 2 mg of estradiol benzoate protocol (n=10/ group). Data were analyzed by logistic regression, by PROC GLIMMIX. The time of follicular wave emergence was not affected by administration of injectable progesterone. Besides, follicular wave emergence occurred between 4.2 and 4.5 days after the beginning of synchronization protocol for all genetic groups. In Experiment 2, the effects of time of OPU relative to follicular wave emergence (1, 3 or 5 days) and of genetic group (Nelore, Holstein, and buffalo) on *in vitro* embryo production were evaluated. A total of 27 heifers (9 of each genetic group, assigned in the 3 times of OPU) were submitted to 6 OPU sessions, in a cross-over design. Oocytes recovered were selected and those viable were submitted to *in vitro* embryo procedures. Data were analyzed by ANOVA, using

PROC MIXED, in which time of OPU, genetic group, replicate and interaction between these factors were considered as fixed effects, and donor was considered as a random effect. Results demonstrated that Nelore heifers showed a better efficiency for *in vitro* embryo production than Holstein or buffalo heifers. Additionally, OPU performed at different times of synchronized follicular wave did not influence *in vitro* embryo production.

Keywords: IVP. OPU. Synchronization of follicular wave. Genetic group.

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras do Capítulo 1

- Figura 1 - Representação do delineamento alternado (“cross-over”) durante o período experimental – Cravinhos – SP 2006..... 41
- Figura 2 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos grau 1 (C) e número de núcleos dos embriões eclodidos (D) – Cravinhos – SP – 2006..... 49

### Figuras do Capítulo 2

- Figura 1 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e dos exames ultrassonográficos de novilhas Nelore (n=10), Holandesas (n=10) e bubalinas (n=10) submetidas a tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona injetável (BE + P4) – Pirassununga – SP – 2008..... 62
- Figura 2 - Dinâmica folicular de novilhas Nelore (n=10), Holandesas (n=10) e bubalinas (n=10) tratadas com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona injetável (BE + P4) no início do protocolo de sincronização – Pirassununga – SP – 2008..... 64
- Figura 3 - Dispersão da emergência da onda de crescimento folicular de acordo com os efeitos principais de tratamento para sincronização (A; BE: n = 15 e BE + P4: n = 15) ou de grupo genético (B; Nelore: n = 10, Holandesas: n=10 e bubalinas: n=10) – Pirassununga – SP – 2008..... 66
- Figura 4 - Representação do delineamento experimental alternado (“cross-over”) – Pirassununga – SP – 2008. Nota: para cada momento de sincronização, há 3 novilhas Bubalinas, 3 Holandesas e 3 Nelore... 72
- Figura 5 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos viáveis (C), taxa de oócitos viáveis (D), número de oócitos no cultivo in vitro (E), número de estruturas clivadas (F) e taxa de clivagem (G) – Pirassununga – SP – 2008..... 82



## LISTA DE TABELAS

### Tabelas do Capítulo 1

Tabela 1 -	Efeito do momento de aspiração folicular (D2, D4 e D6 após a emergência folicular) sobre a recuperação, qualidade oocitária e produção de embriões <i>in vitro</i> em novilhas cruzadas ( <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i> ) – Cravinhos – SP – 2006.....	48
------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Tabelas do Capítulo 2

Tabela 1 -	Efeitos do tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona (BE+P4) em protocolos de sincronização de novilhas Nelore, Holandesas e Bubalinas (GERAL). Pirassununga – SP, 2008.....	65
Tabela 2 -	Efeitos do tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona (BE+P4) em protocolos de sincronização de novilhas Nelore, Holandesas e Bubalinas (EFEITOS PRINCIPAIS) – Pirassununga – SP – 2008.....	66
Tabela 3 -	Valores de P para efeitos principais de grupo genético, momento da OPU e réplica e interações entre estes fatores – Pirassununga – SP – 2008.....	80
Tabela 4 -	Variáveis de OPU - PIV realizada em 1, 3 ou 5 dias após a emergência folicular (D1, D3 ou D5, respectivamente), em novilhas Nelore, Holandesa ou Búfala (NEL, HOL ou BUF, respectivamente; média ± PM) – Pirassununga – SP – 2008.....	81
Tabela 5 -	Efeito do momento da OPU em relação à emergência da onda de crescimento folicular (D1, D3 e D5) sobre a aspiração folicular e produção de embriões <i>in vitro</i> – Pirassununga – SP – 2008.....	87
Tabela 6 -	Efeito do grupo genético (Nelore - NEL, Holandesa - HOL e Búfala - BUF) sobre a aspiração folicular e produção de embriões <i>in vitro</i> – Pirassununga – SP – 2008.....	91

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES</b>	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	23
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	24
4.1	FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE EM BOVINOS E BUBALINOS	24
4.2	DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS E BUBALINOS	27
4.3	COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	29
4.4	INFLUÊNCIA DA FASE DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NA OPU-PIV	31
4.5	INFLUÊNCIA DO GRUPO GENÉTICO NA OPU-PIV	33
4.6	PARTICULARIDADES NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	37
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>EFEITO DO MOMENTO DA OPU EM RELAÇÃO À EMERGENCIA DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR (2, 4 OU 6 DIAS) SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO <i>IN VIVO</i> E A QUALIDADE DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i></b>	38
<b>EXPERIMENTO 1</b>	<b>- EFEITO DO MOMENTO DA OPU EM RELAÇÃO À EMERGENCIA DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR (2, 4 OU 6 DIAS) SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO <i>IN VIVO</i> E A QUALIDADE DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i></b>	39
<b>1</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
2.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES	40
2.2	SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR	40
2.3	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA (OPU)	43
2.4	PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	44
<b>2.4.1</b>	<b>Maturação <i>in vitro</i> (MIV)</b>	44
<b>2.4.2</b>	<b>Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)</b>	44
<b>2.4.3</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i></b>	45

2.4.4	“Feeding” e avaliação da taxa de clivagem	45
2.4.5	Avaliação da taxa de blastocistos	46
2.4.6	Avaliação da taxa de eclosão e contagem de núcleos	46
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4	CONCLUSÕES	56
<b>CAPÍTULO 2 TAXA DE RECUPERAÇÃO <i>IN VIVO</i> E COMPETÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BUBALINOS, ZEBUÍNOS E TAURINOS ASPIRADOS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR</b>		57
<b>EXPERIMENTO 1 - DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS ZEBUÍNAS, TAURINAS E BUBALINAS TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET ASSOCIADO OU NÃO À PROGESTERONA INJETÁVEL</b>		58
1	JUSTIFICATIVA	58
2	HIPÓTESE	59
3	OBJETIVOS	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES	61
4.2	SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DINÂMICA FOLICULAR	61
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	69
<b>EXPERIMENTO 2 - TAXA DE RECUPERAÇÃO <i>IN VIVO</i> E COMPETÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BUBALINOS, ZEBUÍNOS E TAURINOS ASPIRADOS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR</b>		70
7	MATERIAIS E MÉTODOS	70
7.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES	70
7.2	SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR	70
7.3	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA (OPU)	73

7.4	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> (PIV)	74
7.4.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	74
7.4.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	75
7.4.3	Cultivo <i>in vitro</i>	76
7.4.4	“Feeding” e avaliação da taxa de clivagem	76
7.4.5	Avaliação da taxa de blastocistos	76
7.4.6	Avaliação da taxa de eclosão e contagem de núcleos	77
7.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
8	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	79
8.1	INTERAÇÃO ENTRE GRUPO GENÉTICO E RÉPLICA	82
8.2	EFEITO DE MOMENTO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR	87
8.3	EFEITO DE GRUPO GENÉTICO	91
9	<b>CONCLUSÕES</b>	98
10	<b>IMPLICAÇÕES</b>	99
11	<b>CONTRIBUIÇÃO PARA PESQUISAS FUTURAS</b>	100
	<b>REFERÊNCIAS</b>	101
	<b>ANEXOS</b>	114

## 1 INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão do agronegócio, diversas técnicas de reprodução assistida têm sido empregadas e adaptadas com a finalidade de maximizar a produção. Devido aos avanços biotecnológicos é possível obter indivíduos de alto valor produtivo, oriundos tanto de material genético masculino (inseminação artificial), quanto de material genético feminino (superovulação e transferência de embriões, produção *in vitro* e aspiração folicular guiada por ultrassonografia), aumentando a velocidade de seleção.

A técnica pioneira na multiplicação de material genético materno foi a transferência de embriões, primeiramente relatada em coelhos em 1890 por Heape. Em bovinos, no entanto, maior difusão ocorreu a partir da década de 70 quando a abordagem deixou de ser cirúrgica (BALL; PETERS, 2004). Porém, em bubalinos, a eficiência da técnica é inferior em comparação aos bovinos visto que poucas estruturas, geralmente de baixa qualidade, são recuperadas mesmo quando a resposta superovulatória é satisfatória (BARUSELLI et al., 2007; CAMPANILE et al., 2010).

Paralelamente, o desenvolvimento da produção de embriões *in vitro* (PIV) em bovinos tem sido possível há algumas décadas devido à obtenção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro. Entretanto, apesar de ser uma prática bastante difundida, tem havido aumento na demanda por oócitos de animais vivos de alto valor genético, colhidos pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU – *Ovum pick up*; BRENNER, 1999; GALLI et al., 2001). Em bubalinos, o insucesso na transferência de embriões torna a OPU-PIV uma ferramenta mais viável para a espécie. Adicionalmente, a obtenção de oócitos *in vivo* tem se mostrado uma alternativa quando comparada aos provenientes de ovários de matadouro, devido à menor frequência de abate e de descarte do que em bovinos.

A associação da OPU com a PIV, embora promissora, tem apresentado baixas taxas de produção de blastocistos e de prenhez (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; MERTON et al., 2003). Em bubalinos são obtidas taxas de blastocisto entre 9,5 e 30,0% (GASPARRINI, 2002; FERRAZ et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2009), frente aos maiores resultados obtidos em bovinos (entre 30,0 e 45,0%; HASLER et al., 1995). Estes resultados são influenciados por variáveis de ordem técnica e

biológica, sendo que a primeira foi a mais explorada e levou ao desenvolvimento ou adaptação de uma gama de opções em sistemas de aspiração folicular e de cultivo (BOLS et al., 2004). Entretanto, considerando-se os índices atualmente obtidos nas etapas de laboratório, o sucesso da produção *in vitro* de embriões está diretamente relacionado ao número e qualidade dos COCs que são destinados ao cultivo (VIANA; BOLS, 2005).

Um dos fatores que influenciam diretamente a quantidade e qualidade de oócitos obtidos por sessão de aspiração e, conseqüentemente, a competência para produção embrionária, é a fase do ciclo estral (MACHATKOVÁ et al., 1996, 2000; HENDRIKSEN et al., 2000; MERTON et al., 2003; VASSENA et al., 2003). Em *Bos taurus* (HAGEMANN, 1999) e em bubalinos (*Bubalus bubalis*; MANJUNATHA et al., 2007) verificou-se que um folículo dominante é capaz de exercer efeitos negativos sobre folículos subordinados, tais como atresia folicular, e, conseqüentemente, sobre a qualidade dos oócitos contidos nesses folículos. Entretanto, alguns pesquisadores demonstraram que é desejável que os oócitos colhidos por OPU sejam provenientes de folículos em estágio inicial de atresia, uma vez que as alterações produzidas nestes são semelhantes às observadas no momento da ovulação (revisado em HENDRIKSEN et al., 2000; WIT; WURP; KRUIP, 2000; VASSENA et al., 2003).

Com exceção de um estudo realizado em bubalinos, porém com ovários de animais *post-mortem* (MANJUNATHA et al., 2007), não foram descritos os efeitos da fase do ciclo estral sobre os resultados da PIV nesta espécie. Esta seria uma resposta relevante, principalmente do ponto de vista comercial, uma vez que as taxas de recuperação de oócitos e de produção embrionária em bubalinos ainda permanecem inferiores às obtidas em bovinos, como mencionado previamente.

Devido à indefinição sobre qual fase da onda de crescimento folicular seria melhor para elevar os índices da OPU-PIV em *Bos taurus*, e à escassez de informação sobre o assunto tanto em bovinos da raça Nelore e cruzados quanto em bubalinos, o presente estudo foi delineado com base nas hipóteses e objetivos apresentados a seguir.

## 2 HIPÓTESES

As hipóteses do presente estudo são:

1) A OPU realizada após a divergência folicular aumenta a taxa de recuperação e a competência oocitária em relação à realizada antes da seleção folicular (Capítulos 1 e 2).

2) A taxa de recuperação e a competência de oócitos bovinos (Nelore e Holandesa) é maior do que a de oócitos bubalinos (Capítulo 2).

### 3 OBJETIVOS

Para testar as hipóteses, o objetivo geral foi o de determinar em qual fase da onda de crescimento folicular são obtidas maiores taxas de recuperação e competência de oócitos obtidos por OPU em novilhas cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*; Capítulo 1) ou em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*), zebuínas (Nelore; *Bos indicus*) e taurinas (Holandês; *Bos taurus*; Capítulo 2).

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

1) Avaliar e comparar o efeito do momento da OPU em relação à onda de crescimento folicular sobre (Capítulos 1 e 2):

- a taxa de recuperação de oócitos;
- a qualidade de oócitos;
- a qualidade embrionária, pelas taxas de clivagem, de blastocistos, de eclosão, e também pela contagem do número de núcleos dos embriões eclodidos.

2) Avaliar e comparar o efeito de grupo genético sobre (Capítulo 2):

- a taxa de recuperação de oócitos;
- a qualidade de oócitos;
- a qualidade embrionária, pelas taxas de clivagem, de blastocistos, de eclosão, e também pela contagem do número de núcleos dos embriões eclodidos.



## 4 REVISÃO DE LITERATURA

Tendo em vista os avanços observados na OPU-PIV é importante revisar alguns conceitos que servirão de base para a compreensão das hipóteses e objetivos do presente estudo, bem como para a discussão dos resultados nas seções que se seguirão.

### 4.1 FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE EM BOVINOS E BUBALINOS

As características do desenvolvimento dos folículos desde a origem embriológica até a fase antral em cada espécie podem fornecer subsídios para explicar determinadas dificuldades encontradas em trabalhos sobre OPU-PIV, contribuindo para o avanço nas pesquisas com propósito prático.

No início da vida embrionária, as cristas genitais são as estruturas precursoras das gônadas (LIN et al., 2002; AERTS; BOLS, 2010). Estas são invadidas por células germinativas primordiais (CGP) oriundas do endoderme do saco vitelínico, formando os cordões sexuais. Durante os processos de migração e invasão das CGP, as divisões celulares ocorrem por mitose (ADAMS et al., 2008). Os cordões sexuais se desagregam formando “clusters”, se desenvolvendo a “rete ovarii” e o estroma vascular ovariano (LIN et al., 2002). As células germinativas passam a ser denominadas de oogônias, sendo circundadas por células somáticas achatadas, formando os folículos primordiais (HURK; ZHAO, 2005). Em determinado momento da vida fetal, as oogônias passam a se dividir por meiose até a prófase I - tornando-se oócitos primários - permanecendo “bloqueados” nesta fase conhecida como vesícula germinativa (HURK; ZHAO, 2005; ADAMS et al., 2008). A meiose somente é reiniciada após o pico pré-ovulatório de LH (HURK; ZHAO, 2005; AERTS; BOLS, 2010), sendo completada após a fecundação, quando o número diplóide da espécie é restabelecido na forma de zigoto.

A partir da formação dos folículos primordiais, verifica-se o crescimento gradual no diâmetro do oócito, além da proliferação e mudança na conformação das células da granulosa, processo este conhecido como ativação dos folículos

primordiais (BINELLI; MURPHY, 2010). Os folículos passam de primordiais a primários quando a camada única de células da granulosa deixa de ser achatada e se torna cubóide. À medida que aumentam o número de camadas de células da granulosa em torno do oócito e se inicia a deposição de zona pelúcida, estes se tornam folículos secundários. Em seguida, estas estruturas ingressam na fase conhecida como antral, ao adquirir uma cavidade preenchida por fluido folicular entre as células da granulosa e o oócito (ADAMS et al., 2008; AERTS; BOLS, 2010). Em bovinos, folículos primordiais, primários e secundários estão presentes nos ovários fetais aos 90, 140 e 210 dias de gestação (RUSSE<sup>1</sup>, 1983 apud FAIR, 2003, p. 204). Em bubalinos, oogônias e folículos primordiais são encontrados entre 0 e 3 meses de gestação, folículos primários e secundários (pré-antrais) podem ser detectados aos 4 e 6 meses, e folículos antrais são visualizados a partir do 7º mês de gestação (CARVALHO et al., 2007).

No período de ativação dos folículos primordiais o desenvolvimento é regido basicamente por fatores de crescimento, tais como BMP4, BMP7, BMP15, GDF9, bFGF, kit ligand, FIG- $\alpha$ , Lhx8, Sohlh2, Fox12, (AERTS; BOLS, 2010; BINELLI; MURPHY, 2010). Já o estímulo para o crescimento de folículos secundários é dado, ao menos *in vitro*, pelos IGF-1 e 2 (AERTS; BOLS, 2010; BINELLI; MURPHY, 2010). Na fase antral, além dos fatores de crescimento como FGF8, IGF-1 e 2, há uma importante participação das gonadotrofinas, estando o FSH envolvido na fase antral inicial e o LH mais relacionado à fase pré-ovulatória (AERTS; BOLS, 2010; BINELLI; MURPHY, 2010). Da fase primária até a antral são necessários pelo menos 180 dias em bovinos, sendo que destes, no mínimo 42 dias (ou dois ciclos) são requeridos para que o folículo antral complete seu desenvolvimento até a fase pré-ovulatória (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987).

É importante verificar que o número de estruturas ovarianas presentes na vida adulta sofre influência das diversas etapas do desenvolvimento folicular/oocitário: formação das células germinativas primordiais, migração das CGP, colonização das gônadas, diferenciação das CGP em oogônias, proliferação das oogônias, início da meiose, bloqueio em prófase I, atresia durante a fase antral e reativação da meiose devido ao pico pré-ovulatório de LH (HURK; ZHAO, 2005). Neste contexto, do número máximo de oócitos encontrados na vida fetal em bovinos (entre 2.100.000 e

---

<sup>1</sup> RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77–92, 1983.

2.700.000), ocorre redução de cerca de 95% até o nascimento (entre 130.000 e 135.000; HURK; ZHAO, 2005; AERTS; BOLS, 2010; BINELLI; MURPHY, 2010), gerada pelo processo de apoptose (AERTS; BOLS, 2010). Embora não tenham sido encontradas informações sobre o número de células de linhagem germinativa em bubalinos, sabe-se que nesta espécie o número de folículos primordiais é consideravelmente menor do que em bovinos (cerca de 10 vezes menor (MANIK et al., 2002), sendo encontrados entre 10 a 12.000 folículos primordiais; DANELL, 1987). Adicionalmente, também se observa menor número de folículos antrais nos bubalinos quando comparados aos bovinos devido ao processo de atresia ( $47,5 \pm 23,8$  vs.  $233,0 \pm 95,8$ ;  $P < 0,002$ ; LE VAN TY et al., 1989).

Estas informações são particularmente relevantes em programas de OPU-PIV, uma vez que o número de estruturas recuperadas e a qualidade das mesmas são fundamentais para a obtenção de taxas aceitáveis de blastocistos. Em recente estudo (IRELAND et al., 2008) demonstrou-se que a reserva de folículos primordiais, pré-antrais e antrais pode ser estimada pela contagem do número de folículos antrais visualizados durante o ciclo estral de fêmeas bovinas adultas. Animais com alta contagem de folículos antrais apresentam maior reserva ovariana, além de maior número de folículos e oócitos saudáveis (em relação aos atrésicos) e maiores concentrações de hormônio anti-mulleriano (AMH) circulantes do que animais com baixa contagem de folículos antrais. No entanto, este mesmo grupo de pesquisa verificou ainda que animais com baixa contagem de folículos antrais apresentam maiores concentrações de FSH circulantes, regulando positivamente a aromatase, os receptores de estradiol e a produção de estradiol pelas células da granulosa (IRELAND et al., 2009). Os autores especulam que as altas concentrações de estradiol intrafoliculares, associadas à maior responsividade das células do cumulus e dos oócitos ao estradiol, podem levar ao comprometimento na maturação e competência oocitária neste grupo de animais. Com base nestes recentes achados, muito embora ainda não existam trabalhos correlacionando diretamente baixo número de folículos antrais e redução na fertilidade, talvez seja adequado pré-selecionar doadoras de oócitos de acordo com a contagem de folículos antrais.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS E BUBALINOS

Durante o ciclo estral de bovinos e bubalinos observa-se que o desenvolvimento folicular ocorre em ondas. Em bovinos, há variação de uma (SAVIO et al., 1988) a quatro (SIROIS; FORTUNE, 1988; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; ZEITOUN; RODRIGUEZ; RANDEL, 1996), embora seja mais freqüente a ocorrência de duas ou três ondas (PIERSON; GINTHER, 1984; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; KNOPF et al., 1989; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; NOSEIR, 2003; WOLFENSON et al., 2004). Em bubalinos, são relatadas de uma a três (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997; PRESICCE et al., 2004), sendo mais comum o padrão de duas ondas de crescimento folicular (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003; PRESICCE et al., 2004). Em ambas as espécies o número de ondas de crescimento folicular pode ser influenciado por vários fatores como: duração da fase lútea (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; BARUSELLI et al., 1997), baixa ingestão de nutrientes (MURPHY et al., 1991), concentrações plasmáticas de inibina-A e FSH (PARKER et al., 2003), categoria animal (PRESICCE et al., 2004), entre outros.

Cada onda folicular é caracterizada por um grupo de folículos antrais com diâmetros ao redor de 3 a 4 mm que são recrutados (emergência ou recrutamento folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante; FD), enquanto os outros decrescem de tamanho (folículos subordinados; FS; LUCY et al., 1992), estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência ou desvio folicular. Durante a fase luteínica, o FD se torna anovulatório, devido à baixa freqüência na pulsatilidade de LH (regressão e atresia), e uma nova onda se inicia (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; WEBB et al., 1999; DRIANCOURT, 2001). Contrariamente, após a luteólise, o folículo dominante culmina na ovulação (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Embora algumas características da dinâmica folicular de bovinos e bubalinos sejam semelhantes, várias são as diferenças entre estas espécies. Devido ao menor pool folicular encontrado em bubalinos, como citado previamente nesta revisão, é possível que sejam encontradas diferenças no número de folículos no momento do

recrutamento folicular entre bovinos e bubalinos, ainda que não tenham sido relatados na literatura estudos contemporâneos entre estas espécies. Entretanto, verificou-se em recente estudo (CARVALHO et al., 2008) que novilhas *Bos indicus* (Nelore e Gir) apresentam maior número de folículos no momento da emergência folicular ( $33,4^a \pm 3,2$ ) do que novilhas *Bos taurus* (Holandês e Angus;  $25,4^b \pm 2,5$ ), sendo que as cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*; Angus x Nelore e Holandês x Gir;  $29,6^{ab} \pm 2,5$ ) não diferem das outras raças. Esta característica é particularmente importante na escolha de doadoras tanto em programas de superovulação (SOV) quanto de OPU-PIV.

Outro momento no qual são descritas diferenças entre bovinos e bubalinos é a divergência folicular. Embora esta fase ocorra cerca de dois dias e meio a três dias após a emergência folicular ou a ovulação (GINTHER et al., 1996; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2007; GIMENES et al., 2008), os diâmetros alcançados tanto pelo FD quanto pelo maior folículo subordinado (FS) são diferentes de acordo com o grupo genético. Embora nenhum estudo comparativo tenha sido realizado, os tamanhos foliculares médios do FD e FS no desvio folicular parecem ser maiores em Holandesas (8,5 mm e 7,2 mm, respectivamente; GINTHER et al., 1996) do que em bubalinos (7,2 mm e 6,4 mm, respectivamente; GIMENES et al., 2007), e nestes maiores do que em Nelore (6,2 a 5,4 mm para o FD e 5,8 a 5,4 mm para o FS; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008).

Por fim, os diâmetros máximos alcançados em cada onda de crescimento folicular não são semelhantes em bovinos e bubalinos, e talvez isto seja atribuído às diferenças anatômicas existentes entre estas duas espécies, tendo-se em vista que nas búfalas os ovários apresentam menor tamanho e peso quando comparados à vaca bovina (VITTORIA, 1997). Os diâmetros máximos alcançados em *Bos taurus* variam entre 12,9 a 17,1 mm (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989); em *Bos indicus* de 9,4 a 12,1 mm (FIGUEIREDO et al., 1997), e em bubalinos de 11,1 a 15,1 mm (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997), dependendo do número de ondas de crescimento folicular.

O conhecimento de fisiologia é, portanto, fundamental para a compreensão dos resultados obtidos quando biotécnicas como a SOV, a OPU ou a PIV são aplicadas aos diferentes grupos genéticos, demonstrando que estratégias diversas precisam ser empregadas para alcançar máxima eficiência nesses processos.

### 4.3 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

O sucesso das técnicas de OPU-PIV está estritamente relacionado à competência dos oócitos para a produção de embriões *in vitro*. Deste modo, a competência oocitária pode ser caracterizada por alguns eventos-chave, dentre eles: o reinício da meiose, a ativação das clivagens após a fertilização, o desenvolvimento ao estágio de blastocisto, a indução da prenhez e a capacidade de levá-la a termo, e o desenvolvimento saudável a termo (SIRARD et al., 2006). Porém, o critério mais freqüentemente empregado pela maioria dos laboratórios é o desenvolvimento a blastocisto, uma vez que oócitos incompetentes são bloqueados na transição materno-zigótica, que ocorre no estágio de 8 células em bovinos, devido à incapacidade de ativar o genoma embrionário (SIRARD et al., 2006).

Os critérios de seleção de competência oocitária são diversos, podendo levar em consideração a fase de desenvolvimento folicular (que será abordada no próximo tópico), o tamanho dos folículos dos quais são recuperados os oócitos, as características morfológicas e o diâmetro dos oócitos.

O diâmetro dos oócitos está diretamente relacionado à competência dos mesmos, uma vez que em bovinos esta estrutura somente adquire a capacidade de realizar a ativação nuclear a partir de 110 $\mu$ m, o que corresponde a um folículo de aproximadamente de 3mm de diâmetro. Sendo assim, o oócito gradualmente adquire a capacidade de sofrer a maturação, meiose e manter o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997). A capacidade de progressão da meiose *in vitro* aumenta de 21,2% para 80,7% quando se utilizam oócitos com 120  $\mu$ m em relação aos com diâmetro inferiores a 100  $\mu$ m (FAIR; HYTTEL; GREEVE, 1995). Adicionalmente, o desenvolvimento aos estágios de mórula e blastocisto aumenta de 10 para 34%, à medida que o oócito aumenta em diâmetro de 95 para 115  $\mu$ m (ARLOTTO et al., 1996). Em bubalinos, oócitos entre 127  $\mu$ m a diâmetros superiores a 163  $\mu$ m apresentam taxas semelhantes de maturação nuclear e expansão de *cumulus* (em torno de 60% e 85%, respectivamente), entretanto, taxas significativas de blastocistos são obtidas somente após os oócitos alcançarem diâmetro superior a 145  $\mu$ m (RAGHU; NANDI; REDDY, 2002).

Quanto à classificação morfológica em graus, podem ser avaliados o revestimento por células do *cumulus* e/ou a homogeneidade do citoplasma dos oócitos. Quando ambos métodos são utilizados, a classificação varia em escala de 1 a 4 (LEIBFRIED; FIRST, 1979; LOOS et al., 1989), sendo que oócitos de grau 1 apresentam mais de 3 camadas compactas de *cumulus* com ooplasma homogêneo, os de grau 2 apresentam de 1 a 2 camadas de *cumulus* com ooplasma homogêneo ou discretamente heterogêneo, os de grau 3 apresentam camadas de *cumulus* discretamente expandidas e ooplasma irregular podendo conter granulações escurecidas e, por fim, os de grau 4 são os oócitos desnudos, expandidos ou com ooplasma irregular. Alguns autores indicam que oócitos de graus 1 a 3 apresentam igual capacidade de desenvolvimento, havendo comprometimento apenas nos de grau 4 (LOOS et al., 1989), principalmente nos desnudos (YANG; LU, 1990; WARD et al., 2000). Este critério pode ser empregado tanto em bovinos quanto em bubalinos, embora nestes últimos seja observado maior número de oócitos de baixa qualidade (principalmente desnudos ou parcialmente desnudos), devido à fragilidade na ligação entre as células da granulosa (GASPARRINI, 2002). Além disso, há menor compactação do *cumulus* nesta espécie em relação aos bovinos (OHASHI et al., 1998) e maior taxa de atresia folicular (DANELL, 1987; TY et al., 1989).

O diâmetro folicular no momento da recuperação de oócitos tem sido o parâmetro mais utilizado na tentativa de elevar os índices obtidos em sistemas de produção embrionária *in vitro* (VASSENA et al., 2003). Alguns autores demonstraram que oócitos contidos em folículos inferiores a 2 mm são menos competentes que folículos de diâmetro superior, não se desenvolvendo além de 8 células (TAN; LU, 1990; PAVLOK et al., 1992). Embora existam relatos de que não há diferenças nas taxas de recuperação, clivagem ou blastocistos entre folículos menores ou maiores do que 4 mm (SENEDA et al., 2001), há indícios de que folículos maiores do que 6 mm apresentem melhor competência para o desenvolvimento a blastocisto (LONERGAN et al., 1992). Em bubalinos, verificou-se que a competência dos oócitos aumenta à medida que aumenta o diâmetro folicular, de 2,4%<sup>a</sup> de blastocistos em folículos menores do que 3 mm, para 7,2%<sup>b</sup> em folículos médios (entre 3 e 8 mm), a 16,9%<sup>c</sup> em folículos grandes (maiores do que 8 mm; RAGHU; NANDI; REDDY, 2002).

#### 4.4 INFLUÊNCIA DA FASE DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NA OPU-PIV

Embora o tamanho folicular esteja relacionado à competência oocitária, observa-se que folículos de mesmo diâmetro nem sempre resultam em produções embrionárias semelhantes, devido às diferenças no status fisiológico dos oócitos recuperados (VASSENA et al., 2003). Neste sentido, diversos autores reportam que a fase do ciclo estral no momento da punção folicular tem influência sobre as taxas de recuperação, qualidade oocitária e produção de embriões *in vitro* (MACHATKOVÁ et al., 1996, 2000; HENDRIKSEN et al., 2000; MERTON et al., 2003; VASSENA et al., 2003).

Cronologicamente, Tan e Lu (1990) foram os primeiros autores a pesquisar o efeito da fase folicular sobre o desenvolvimento de embriões *in vitro*. Neste estudo, ovários provenientes de matadouro foram classificados macroscopicamente de acordo com a fase luteínica (inicial, “intermediária” e tardia), e os oócitos foram recuperados e submetidos à PIV. Como resultados, os autores não observaram efeito da fase do ciclo estral, mas verificaram um efeito do diâmetro folicular sobre a taxa de clivagem e blastocistos, como previamente descrito.

No entanto, outro grupo de pesquisa (MACHATKOVÁ et al., 1996) conseguiu demonstrar que, em doadoras previamente sincronizadas com 2 doses de PGF2 $\alpha$ , oócitos colhidos em diferentes fases do ciclo estral (dias: 2, 7-9, 14-16 ou 19-20) apresentam diferentes potenciais para a produção de blastocistos, obtendo os melhores resultados entre os dias 14 a 16 do ciclo estral (24,3%), e os piores entre os dias 19 a 20 (6,6%). Estes autores discutem sobre a importância do momento adequado para tratamentos hormonais a fim de minimizar os efeitos supressivos do folículo dominante sobre a resposta superovulatória e sobre a produção de embriões. Neste sentido, Hagemann (1999) verificou que o folículo dominante é capaz de atuar negativamente sobre a competência dos oócitos provenientes de folículos subordinados. Isto também foi constatado em bubalinos (MANJUNATHA et al., 2007), ao avaliar a competência *post mortem* de oócitos provenientes de folículos em diversas fases do ciclo estral (ausência de FD com presença de corpo hemorrágico ou CL maduro, presença de FD com CL maduro ou em regressão, e ovários de animais em anestro). Neste estudo notou-se que, embora oócitos oriundos de folículos dominantes tenham melhor competência do que os de



subordinados, a presença de um FD em qualquer ovário promoveu menores taxas de embriões transferíveis do que na ausência do mesmo. Em casos de elevado grau de atresia, observado quando a dominância folicular está estabelecida, há comprometimento da competência oocitária (HENDRIKSEN et al., 2000; MERTON et al., 2003).

Contudo, verificou-se em *Bos taurus* que oócitos provenientes de folículos com discreto grau de atresia apresentam maiores taxas de desenvolvimento embrionário e ainda requerem menor tempo para a maturação *in vitro* (HENDRIKSEN et al., 2000; WIT; WURT; KRUIP, 2000; VASSENA et al., 2003). Isto é decorrente da semelhança que ocorre entre oócitos oriundos de folículos pré-ovulatórios e pequenos folículos em fase inicial de atresia, os quais sofrem alterações ultra-estruturais em seu interior e nas células do *cumulus* (HENDRIKSEN et al., 2000). Inversamente, oócitos sem sinais de atresia requerem maior tempo de maturação, pois ainda não concluíram a metáfase II (WIT; WURT; KRUIP, 2000).

Corroborando com as afirmações acima, Salamone, Adams e Mapletoft (1999) observaram que maiores taxas de mórulas foram obtidas em novilhas taurinas no 5º e 6º dias do ciclo estral (25,6%; considerada fase de regressão por estes autores) em comparação com aqueles no 1º dia (12,2%; fase de crescimento) ou entre o 2º e 4º dias (14,4%; fase estática). Adicionalmente, menores porcentagens de embriões expandidos e eclodidos nove dias após a FIV foram detectadas no grupo em fase de crescimento folicular. De maneira semelhante, Vassena et al. (2003) ao compararem as taxas de produção de blastocistos de vacas taurinas nos dias 2, 3, 5 e 7 da primeira onda folicular, equivalentes às fases de crescimento, estática inicial, estática tardia e de regressão no desenvolvimento folicular, verificaram que os melhores resultados foram obtidos no dia 5 após a emergência folicular (23% de embriões versus 12% para o dia 2, 13% para o dia 3 e 16% para o dia 7).

Todavia, parece haver certa controvérsia quanto ao momento exato para realizar a colheita de oócitos, visto que em vacas Nelore previamente sincronizadas e submetidas à OPU 3, 5, 7 ou 9 dias após a emergência folicular, foram constatados maiores número e taxa de produção de blastocistos nos dois primeiros grupos em relação aos dois últimos (66 e 62 vs. 34 e 35; 49,0 e 45,3% vs. 33,0 e 36,1%, respectivamente; MELO, 2007). Adicionalmente, em vacas lactantes Holandesas, relatou-se que a eficiência da OPU pôde ser melhorada quando se

utilizou o período inicial do desenvolvimento folicular (dias 1 a 3 do ciclo estral) quando comparado à fase de dominância (dias 15 e 16), devido ao maior número de folículos visualizados nos ovários, não havendo, entretanto, diferenças quanto à produção de embriões *in vitro* (MACHATKOVÁ et al., 2000).

Finalmente, em recente investigação (RAMOS et al., 2010) não se verificou efeito do momento de sincronização sobre a OPU-PIV. Novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) foram previamente sincronizadas com a associação de benzoato de estradiol e implante auricular de norgestomet, o qual foi removido 7 dias após, momento no qual os animais receberam uma dose de PGF2 $\alpha$  e foram submetidos à aspiração de todos os folículos maiores do que 3 mm. As novilhas foram então distribuídas em 3 grupos: OPU duas vezes por semana, OPU uma vez por semana ou OPU uma vez por semana associada à uma dose de benzoato de estradiol logo após a OPU. Deste modo, os animais estariam com 3 ou 4 dias após a emergência folicular (primeiro e terceiro grupos) ou com 6-7 dias (segundo grupo). Entretanto, o grupo tratado com benzoato se comportou como o grupo que foi aspirado uma vez por semana, e não foram observadas diferenças entre nenhum dos três grupos nem nas taxas de recuperação ou qualidade de oócitos, nem nas taxas de produção de blastocistos.

Apesar dos achados e das suposições anteriormente mencionados, ainda não há um consenso sobre qual o melhor momento para a realização da OPU, tendo em vista a melhoria dos resultados na PIV.

#### 4.5 INFLUÊNCIA DO GRUPO GENÉTICO NA OPU-PIV

A associação da OPU-PIV em bovinos vem sendo realizada há cerca de três décadas, com produção de blastocistos variando entre 30,0 a 45,0% (HASLER et al., 1995). Contudo, essas técnicas são mais recentes e ainda inconsistentes em bubalinos, contando com taxas bastante inferiores, variando entre 9,5% a 30,0% (GASPARRINI, 2002; FERRAZ et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2009). Embora tais resultados possam ser decorrentes de períodos diversos de desenvolvimento técnico, ainda não se sabe se há algum fator inerente à própria espécie que os diferencie quanto à eficiência em ambos processos.

Em estudos realizados em *Bos taurus* (ROTH et al., 2001; PETYM et al., 2003; RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; FOULADI-NASHTA et al., 2007), as taxas de recuperação de oócitos por OPU oscilam entre 36,0 a 88,4%, uma vez que o número de folículos visualizados está entre 4,1 a 16,9 e são colhidos entre 2,8 a 8,0 oócitos totais. Quanto ao número de oócitos viáveis, são relatadas de 1,8 a 4,1 estruturas/ OPU/ doadora. Com relação às taxas de blastocistos, as maiores variações parecem ser decorrentes das diferentes categorias (nulípara: 8,1% de blastocistos 7 dias após a fecundação vs. múltipara: 12,4%; RIZOS et al., 2005), sazonalidade (estações quentes: 20% de blastocistos 8 dias após a fecundação vs. estações frias: > 30%; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002) ou estresse térmico (verão com estresse térmico: 11,4%<sup>a</sup>, verão com sistema de dispersão de calor: 10,3<sup>a</sup> e inverno: 29,9<sup>b</sup>; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). No caso de estresse térmico, o aumento na frequência de aspiração em ciclos subsequentes promove melhoria na produção de blastocistos, devido à remoção dos folículos afetados e emergência de novo pool de folículos saudáveis (ROTH et al., 2001). Em recente estudo (FERREIRA et al., 2010), foram comparadas a OPU-PIV de diferentes categorias de Holandesas (novilhas - N, vacas em pico de lactação - PL e “repeat breeders” - RB) em estresse térmico no verão. Verificou-se que na OPU, as novilhas apresentaram maior número de folículos visualizados do que as vacas em pico de lactação ( $18,5 \pm 1,9^a$  vs.  $12,4 \pm 1,1^b$ ), porém não diferiram das “repeat breeder” ( $17,2 \pm 2,0^{ab}$ ). Este mesmo comportamento foi observado para oócitos totais (N =  $9,6 \pm 1,6^a$ ; PL =  $5,0 \pm 0,9^b$ ; RB =  $8,8 \pm 1,3^{ab}$ ) e viáveis (N =  $7,6 \pm 1,5^a$ ; PL =  $3,6 \pm 0,8^b$ ; RB =  $6,8 \pm 1,2^{ab}$ ). Entretanto na PIV, as novilhas foram superiores a ambas categorias de vacas (taxa de clivagem: N = 47,8%<sup>a</sup>; PL = 31,1%<sup>b</sup>; RB = 35,4%<sup>b</sup>; taxa de blastocistos: N = 21,0%<sup>a</sup>; PL = 4,1%<sup>b</sup>; RB = 3,8%<sup>b</sup> e número de embriões grau 1: H =  $1,3 \pm 0,4^a$ ; PL =  $0,3 \pm 0,2^b$ ; RB =  $0,5 \pm 0,2^b$ ). Os autores atribuíram as diferenças nos resultados entre novilhas e vacas provavelmente devido às diferenças no metabolismo frente ao estresse térmico. Embora as “repeat breeders” tenham apresentado resultados na OPU semelhantes às novilhas, os piores índices na PIV podem ser decorrentes de comprometimento oocitário.

Já em *Bos indicus*, taxas de recuperação variando de 50,0 a 79,0% são reportadas, sendo entre 6,8 a 19,5 folículos visualizados, entre 4,0 a 15,2 oócitos totais, com taxa de viáveis (graus 1 a 3) entre 67,0 a 92,6% (SENEDA et al., 2001;

MANIK; SINGLA; PALTA, 2003; VIANA et al., 2004; MELO, 2007). Os principais fatores que parecem afetar os resultados na PIV neste grupo genético estão relacionados à frequência de aspiração folicular (em Gir; 1x/ semana: 21,6%<sup>b</sup> de blastocistos aos 7 dias após a FIV, 2x/ semana: 31,8%<sup>a</sup> e controle: 21,0%<sup>b</sup>; VIANA et al., 2004) e à categoria animal (em cruzadas *Bos indicus*; bezerras entre 4 e 7 meses: 19,1%<sup>b</sup> de blastocisto aos 7 dias após a FIV e vacas entre 4 a 9 anos de idade: 36,0%<sup>a</sup>; CAMARGO et al., 2005).

Contudo, há indícios de que, ao menos *in vitro*, *Bos taurus* comporta-se diferentemente de *Bos indicus*, como se pode verificar em alguns estudos comparativos. Paula-Lopes et al. (2003) avaliaram o efeito do estresse térmico induzido em embriões bovinos de 8 células de várias raças (Brahman, Senepol, Holandês e Angus). Neste estudo, observou-se que houve tendência de maior taxa de clivagem para a raça Brahman (> 80%), e que o efeito negativo do estresse térmico sobre o desenvolvimento a blastocisto nos dias 8 e 9 foi menos pronunciado em Brahman (grupo controle: aproximadamente 30 e 35% vs. grupo estresse térmico: aproximadamente 15 e 20%, respectivamente) do que em Holandesas (grupo controle: aproximadamente 30 e 35% vs. grupo estresse térmico: inferior a 5 % em ambos dias de cultivo, respectivamente) e Angus (grupo controle: aproximadamente 50 e 60% vs. grupo estresse térmico: inferior a 5 % em ambos dias de cultivo, respectivamente). Da mesma maneira, embriões Brahman foram menos afetados do que os Holandeses ou Angus quanto ao estágio de desenvolvimento 9 dias após a fecundação (blastocisto expandido ou eclodido) e também quanto ao número de núcleos neste mesmo momento. Os autores concluíram que bovinos da raça Brahman estão melhor adaptados ao estresse térmico, ao nível celular, do que os da raça Holandesa ou Angus. Corroborando com esses achados, um recente estudo (ESCALONA et al., 2008) comparou oócitos provenientes de ovários de matadouro de fêmeas Holandesas e Brahman, e constatou que a porcentagem de blastocistos foi maior em Brahman do que em Holandesas (29,5% vs. 17,5%, respectivamente), sugerindo melhor qualidade oocitária para a primeira raça, fato que pode estar relacionado à melhor adaptação ao estresse térmico. Em outro trabalho (BILBY et al., 2006), oócitos de Holandesas e não Holandesas obtidos a partir de ovários provenientes de matadouro foram utilizados como controle interno para um experimento de OPU no qual foram avaliadas várias dietas sobre os resultados da PIV. Não se verificou efeito de raça

para taxa de clivagem (78,9% para Holandês e 68,0% para não Holandês), contudo, o estágio de desenvolvimento foi mais avançado em embriões não Holandeses, tanto para alcançar o estágio de oito células 3 dias após a fecundação (aproximadamente 40% para não Holandês e aproximadamente 30% para Holandês), quanto para o desenvolvimento a blastocisto 8 dias após a FIV (35,1% vs. 21,2%, respectivamente). Neste trabalho, as taxas obtidas em matadouro foram superiores às obtidas na OPU, mesmo em Holandesas. Sendo assim, os autores julgam que não somente há efeito de raça, mas também o efeito “post-mortem” (pré-maturação) incrementando os resultados na PIV, fato previamente relatado por Blondin et al. (1997).

Em bubalinos, taxas de recuperação entre 42,0 e 69,5% são descritas. Entretanto, são encontrados menores números de folículos visualizados (1,4 a 9,0), de oócitos totais (0,7 a 5,9), bem como taxa de oócitos viáveis (53,5 a 86,6%; BONI; ROVIELO; ZICARELLI, 1996; PROMDIREG et al., 2005; GUPTA et al., 2006; MANJUNATHA et al., 2008; MANJUNATHA et al., 2009). Os resultados nesta espécie são bastante variáveis e parecem derivar principalmente das diversas possibilidades de sistemas de cultivo empregadas em cada laboratório. Em sistema de co-cultivo, são descritas taxas de blastocisto eclodido de 16,7% aos 7 dias após a FIV ao se utilizar monocamada de células BRL (buffalo rat liver; BONI; ROVIELO; ZICARELLI, 1996), ao passo que trabalhos desenvolvidos em monocamada de células de oviduto bubalino resultaram em taxas de 32% de embriões transferíveis (MANJUNATHA et al., 2008). Em sistema de cultivo com mistura de gases (5% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub> e 88% N<sub>2</sub>), Neglia et al. (2003) discutiram sobre as diferenças nas taxas de blastocisto aos 7 dias após a FIV de acordo com a origem dos oócitos. Neste estudo, oócitos bubalinos obtidos *in vivo* produziram maiores taxas do que aqueles obtidos *post-mortem* (29,7<sup>a</sup> vs. 19,9<sup>b</sup>, respectivamente). Adicionalmente, estes autores observaram que oócitos bovinos provenientes de ovários de matadouro apresentaram melhor eficiência do que os oócitos bubalinos *post-mortem* (29,7<sup>a</sup> vs. 19,9<sup>b</sup>, respectivamente). Algumas linhas de pesquisa em PIV de bubalinos buscam o enriquecimento do meio de cultivo com antioxidantes para melhorar a produção de blastocistos (GASPARRINI et al., 2006; ANAND et al., 2008; SINGHAL et al., 2009), sendo relatadas taxas entre 7,7 a 30,9%.

#### 4.6 PARTICULARIDADES NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

Tão importante quanto a origem dos oócitos é o destino destes para a produção de embriões *in vitro*. Tem-se estabelecido que as condições de cultivo utilizadas para a MIV de oócitos bovinos influenciam significativamente a FIV e o subsequente desenvolvimento embrionário (GORDON<sup>2</sup>, 1994 apud MACHATKOVÁ et al., 1996, p. 801). Usualmente os meios de MIV são suplementados com soro bovino, fluido folicular ou soro fetal bovino, estradiol e gonadotrofinas, ou co-cultivo com células da granulosa, células de oviduto ou outras linhagens celulares, assim com a adoção de meios condicionados (MACHATKOVÁ et al., 1996).

Há menos de duas décadas, pesquisas vem sendo desenvolvidas para o enriquecimento dos meios de maturação com cistina e cisteamina na espécie bovina (MATOS et al., 1995; MATOS; FURNUS; MOSES, 1997), e mais recentemente também em bubalinos (GASPARRINI et al., 2000; GASPARRINI et al., 2006). Estes compostos, quando presentes nos meios de maturação, elevam a síntese de glutathiona reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a porcentagem de embriões produzidos nos sistemas *in vitro*. Em bubalinos este aspecto é particularmente importante, devido à elevada concentração de lipídios presentes no citoplasma dos oócitos e embriões (GASPARRINI, 2002).

---

<sup>2</sup> GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994.

# *CAPÍTULO I*

*Efeito do momento da OPU em relação à  
emergência da onda de crescimento folicular  
(2, 4 ou 6 dias) sobre a taxa de recuperação in  
vivo e a qualidade de oócitos e de embriões  
bovinos produzidos in vitro*

**EXPERIMENTO 1 - EFEITO DO MOMENTO DA OPU EM RELAÇÃO À EMERGENCIA DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR (2, 4 OU 6 DIAS) SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO *IN VIVO* E A QUALIDADE DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**1 JUSTIFICATIVA**

O presente experimento foi inicialmente delineado como piloto do projeto de Doutorado.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Foram utilizadas 30 novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*), com idades variando entre 2 e 3 anos e condição corporal  $\geq 3$ , provenientes da central de receptoras da Vitrogen® Brasil (Cravinhos – SP). O período experimental foi de julho a agosto de 2006. Os animais em estudo foram mantidos a pasto (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*), com suplementação mineral e água *ad libitum*.

### 2.2 SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

Todos os animais foram submetidos à sincronização da emergência da onda de crescimento folicular pela associação de 2 mg de benzoato de estradiol (Cronibest®, Biogenesis, Brasil) com 50mg de progesterona injetável (Progesterona injetável, Innovare Saúde Animal, Brasil) no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (Cronipress®, Biogenesis, Brasil). A fim de eliminar a maioria dos corpos lúteos, uma dose de PGF2 $\alpha$  (Croniben®, Biogenesis, Brasil) foi também administrada no início do tratamento hormonal, conforme esquematizado na figura 1. A emergência da nova onda de crescimento folicular foi considerada como D0, sendo D2, D4 e D6 os períodos adotados no presente estudo para a realização da OPU. O período de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona foi de 6, 8 ou 10 dias, visto que em estudo prévio realizado em bovinos, o momento esperado da emergência da nova onda folicular foi em média de quatro dias após o início do protocolo ( $4,0 \pm 0,08$  dias; MARTINS et al., 2005).

Para remover o efeito individual sobre os resultados do estudo, cada fêmea passou por todos os tratamentos, em 3 réplicas realizadas com intervalos de aspiração de 14 dias (incluindo o período de ressincronização da emergência folicular), em delineamento alternado “cross-over”, como demonstrado na figura 1.

Como se pode observar na figura 1, os momentos de sincronização da emergência folicular foram diferentes para cada grupo experimental, entretanto, as aspirações foram realizadas no mesmo dia a cada réplica.

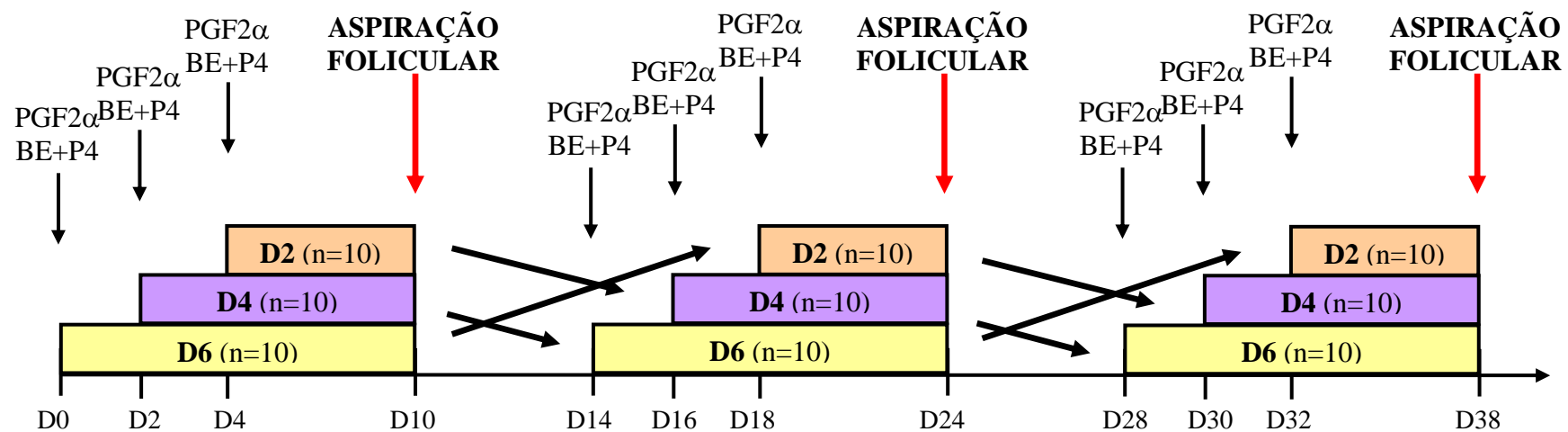


Figura 1 - Representação do delineamento alternado ("cross-over") durante o período experimental – Cravinhos – SP – 2006

### 2.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA (OPU)

Os animais foram contidos em brete e submetidos à anestesia epidural, realizada no espaço sacrococcígeo, utilizando volume de 3 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Lidovet®, Bravet).

Previamente às aspirações, os folículos de ambos ovários foram contados através de ultra-sonografia transvaginal (Aloka 500®, Tóquio, Japão; frequência 5 MHz). As punções foliculares foram realizadas com o mesmo aparelho acoplado a um sistema com cateter 49x13 mm descartável (18G, Angiocath®, B-D) e pressão na bomba de vácuo média de 86mmHg (entre 16 e 19 ml de água/ minuto). O sistema de tubos siliconizados foi lavado com solução fisiológica a 0,9% adicionada de heparina sódica (5000UI/ L; Parinex®, Hypolabor), 1% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell) e 0,1% de solução de antibióticos (Anexo A). Esta solução, aquecida a 38°C, foi a mesma empregada para colher os oócitos aspirados. Os folículos visíveis ( $\geq 2$ mm) foram puncionados e o fluido contendo os oócitos foi colhido em tubo cônico de 50 mL.

Após a aspiração, o conteúdo dos tubos cônicos foi despejado em filtro para colheita de embriões (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada) e lavado com o mesmo meio descrito anteriormente até obtenção de líquido translúcido, com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o filtro foi vertido em placas de Petri para realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos complexos *Cumulus*-oócitos (CCOs), sob lupa estereomicroscópica. Os critérios considerados para a avaliação dos CCOs foram a presença, o número de camadas e o grau de compactação das células do *Cumulus*, bem como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Foram considerados viáveis e, conseqüentemente, utilizados para produção *in vitro*, somente os oócitos classificados como graus I, II e III, enquanto os demais (desnudos, degenerados, expandidos e atrésicos) foram descartados. Entretanto, todas as estruturas obtidas por animal foram quantificadas e utilizadas para o cálculo do número de oócitos totais.

Os oócitos viáveis foram envasados em criotubos de 1,2 mL (Corning) contendo meio de lavagem de oócitos (H199; Anexo B), e mantidos em garrafa

térmica a 35°C, até a chegada ao Laboratório de Produção de Embriões *in vitro* da Vitrogen®, Cravinhos - SP.

## 2.4 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO

### 2.4.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Ao chegar ao laboratório, o conteúdo do criotubo foi vertido em placa de Petri pequena, onde os CCOs foram novamente procurados e, posteriormente, lavados duas vezes em gotas de 100 µL de meio de lavagem (H199) e, posteriormente, duas vezes em meio maturação (B199; Anexo C).

Após a lavagem dos oócitos, grupos de 25 estruturas foram depositados em gotas de 70 µL de B199, cobertas com óleo mineral estéril. As placas foram levadas à estufa durante 24 horas (contadas a partir do momento da aspiração folicular), a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada.

### 2.4.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Uma hora antes do término do período de maturação, o sêmen de um mesmo touro e partida foi selecionado pelo método de gradiente de Percoll (45 e 90%; Anexo D). Uma palheta de 0,25 mL foi descongelada a 35°C durante 30 segundos, e seu conteúdo foi depositado cuidadosamente sobre o gradiente de Percoll, para posterior centrifugação a 320 G (Baby Fanen®, Fanen) durante 30 minutos. O pellet formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll, e seu volume foi calculado. Cinco µl deste pellet foram colocados em ependorf com 250 µL de água, para avaliação de concentração em Câmara de Neubauer, e outros cinco µL foram depositados em ependorf com 250 µL de meio FIV (Anexo E), para observação de motilidade em microscópio óptico. A partir destes dados, foi realizado

o cálculo para a diluição do sêmen em meio FIV, de modo que a dose inseminante foi de 2 milhões de espermatozoides/ mL.

Durante a centrifugação do sêmen, a placa de maturação foi retirada da estufa para lavar duas vezes os COCs em gotas de 100  $\mu$ L de meio FIV, e os oócitos foram transferidos em grupos de 25 para gotas de 70  $\mu$ L de meio FIV. Em seguida, a dose inseminante foi depositada em cada gota, e as placas de FIV foram deixadas na estufa durante aproximadamente 18 a 22 horas, sob as mesmas condições de atmosfera, umidade e temperatura empregadas para a MIV.

### **2.4.3 Cultivo *in vitro***

Após o período de fecundação, os presumíveis zigotos foram transferidos para placa contendo gotas de 150  $\mu$ L de meio de cultivo CR4, onde os oócitos foram desnudados com auxílio de pipeta calibrada em 75  $\mu$ L, para retirada total das células do *Cumulus*. Após o total desnudamento dos presumíveis zigotos, estes foram lavados duas vezes em gotas de 100  $\mu$ L de meio CR4. As placas empregadas na MIV, as quais continham uma monocamada de células do *Cumulus* no fundo de cada gota, foram reutilizadas no CIV (sistema de co-cultivo). Procedeu-se com a remoção do meio de maturação e substituição por meio de cultivo, após duas lavagens prévias com CR4. Posteriormente, os presumíveis zigotos foram transferidos para as placas de CIV contendo gotas de 50  $\mu$ L, que foram mantidas a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada.

### **2.4.4 “Feeding” e avaliação da taxa de clivagem**

Após 72 horas da fecundação, 1/3 do meio de cultivo antigo foi removido e substituído por 1/3 de CR4 fresco. Nesse momento foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões.

#### **2.4.5 Avaliação da taxa de blastocistos**

No 6º, 7º e 9º dias após a fecundação, os embriões foram avaliados morfológicamente e classificados de acordo com os padrões da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

#### **2.4.6 Avaliação da taxa de eclosão e contagem de núcleos**

A taxa de eclosão foi verificada 9 dias após a FIV. Os embriões eclodidos foram fixados em solução de paraformaldeído 2%, e permaneceram refrigerados (4°C) até a montagem das lâminas para a contagem de núcleos. Para esta finalidade, os embriões foram mantidos durante 5 minutos em solução de Hoescht 33342/ PBS (1:10). Após este período, os embriões foram lavados em PBS, e em seguida colocados sobre lâmina contendo uma gota de 5-10 µL de glicerol, respeitando-se o número de 5-10 embriões por lâmina. Rapidamente a lâmina foi coberta com uma lamínula, e a leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência.

### **2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis-resposta: número de folículos visualizados, número de oócitos totais, taxa de recuperação (número de oócitos totais/ número de folículos visualizados), graus de qualidade oocitária (1, 2, 3, desnudos, degenerados, cumulus expandido e atrésicos), número de oócitos viáveis (oócitos de graus 1 a 3), taxa de oócitos viáveis (número de oócitos viáveis/ número de oócitos totais), número de embriões clivados, taxa de clivagem (número de embriões clivados/ número de oócitos viáveis), número de blastocistos 6 dias pós FIV, taxa de blastocistos 6 dias pós FIV (número de blastocistos 6 dias pós FIV/ número de oócitos viáveis), número de blastocistos 7 dias pós FIV, taxa de blastocistos 7 dias

pós FIV (número de blastocistos 7 dias pós FIV/ número de oócitos viáveis), número de blastocistos 9 dias pós FIV, taxa de blastocistos 9 dias pós FIV (número de blastocistos 9 dias pós FIV/ número de oócitos viáveis), número de blastocistos eclodidos, taxa de eclosão (número de blastocistos eclodidos/ número de blastocistos 7 dias pós FIV) e número de núcleos dos embriões eclodidos, foram analisadas através de ajustes de modelos lineares mistos (PROC MIXED do programa SAS for Windows 2000). O momento de aspiração (D2, D4 e D6), a réplica e a interação entre estes fatores foram incluídos no modelo estatístico. O efeito de animal foi considerado no modelo como fator de efeito aleatório.

A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias dos dados foram verificadas previamente. A maior parte das variáveis não atendeu às premissas e para tanto, foram transformadas (raiz quadrada e log10 para contagens e arcoseno para a raiz quadrada das proporções – as taxas foram expressas em termos de proporções). Quando houve efeito significativo da variável as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, considerando-se significância quando  $P < 0,05$ .



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente experimento estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeito do momento de aspiração folicular (D2, D4 e D6 após a emergência folicular) sobre a recuperação, qualidade oocitária e produção de embriões *in vitro* em novilhas cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) – Cravinhos – SP – 2006

	D2 (n=10)	D4 (n=10)	D6 (n=10)	Valores de P		
				Momento OPU	Réplica	Momento x Réplica
Número de réplicas	3	3	3	-	-	-
Número de folículos visualizados	25,0±1,6	23,5±1,9	21,7±1,5	0,09	0,04	0,06
Número de oócitos totais	19,9±2,1	19,5±1,8	18,8±1,5	1,00	0,08	0,04
Taxa de recuperação (%)	75,0±3,8%	78,8±3,6%	83,2±3,5%	0,09	<0,01	0,97
Oócitos de grau I	1,3±0,2	1,5±0,3	1,3±0,3	0,86	<0,01	0,03
Oócitos de grau II	3,1±0,5	3,0±0,4	3,5±0,5	0,68	0,03	0,39
Oócitos de grau III	11,1±1,8	10,1±1,3	9,5±0,9	0,61	0,10	0,30
Oócitos desnudos	0,3±0,2	0,2±0,1	0,1±0,1	0,64	<0,01	0,81
Oócitos com cumulus expandido	0,4±0,1	0,5±0,2	0,2±0,1	0,20	0,31	0,66
Oócitos degenerados	2,5±0,2	2,7±0,4	2,7±0,4	0,96	<0,01	0,40
Oócitos atrésicos	1,2±0,2	1,4±0,3	1,5±0,2	0,71	<0,01	0,45
Número de oócitos viáveis	15,5±1,9	14,6±1,6	14,2±1,4	0,88	0,45	0,06
Taxa de oócitos viáveis (%)	74,2±2,2	71,3±2,3	72,3±2,5	0,42	0,14	0,29
Número de embriões clivados	9,5±1,0	9,2±1,2	9,1±1,0	0,39	0,04	0,05
Taxa de clivagem (%)	65,0±3,3%	59,2±3,2%	63,3±3,3%	0,42	0,15	0,93
Número de blastocistos 6 dias pós FIV	5,1±0,7	3,9±0,6	4,6±0,6	0,10	0,01	0,33
Taxa de blastocistos 6 dias pós FIV (%)	35,0±3,4% <sup>a</sup>	26,1±3,2% <sup>b</sup>	36,5±3,9% <sup>a</sup>	0,03	0,03	0,89
Número de blastocistos 7 dias pós FIV	6,3±0,8	5,2±0,7	5,8±0,8	0,28	<0,01	0,41
Taxa de blastocistos 7 dias pós FIV (%)	50,8±4,3%	44,1±4,7%	50,8±4,5%	0,32	<0,01	0,95
Número de blastocistos 9 dias pós FIV	7,0±0,9	5,7±0,7	6,0±0,8	0,19	<0,01	0,07
Taxa de blastocistos 9 dias pós FIV (%)	56,1±4,6%	47,7±4,6%	50,2±4,8%	0,22	<0,01	0,80
Número de blastocistos eclodidos	6,1±0,8 <sup>a</sup>	4,6±0,7 <sup>b</sup>	4,7±0,8 <sup>b</sup>	0,04	<0,01	0,29
Taxa de eclosão (%)	90,5±2,6%	82,1±5,1%	67,1±6,6%	0,09	0,34	0,97
Número de núcleos dos embriões eclodidos	172,0±4,7 <sup>a</sup>	155,1±5,8 <sup>b</sup>	165,3±5,3 <sup>ab</sup>	0,02	<0,01	0,01

Os dados estão descritos como média ± EPM

As variáveis descritas como contagens representam o número de estruturas/ doadora/ sessão

Houve interação entre momento da OPU e réplica para número de oócitos totais, número de oócitos grau 1 e número de núcleos dos embriões eclodidos (Figura 2). Ainda que a interação réplica x momento da OPU não tenha sido verificada para a variável número de folículos visualizados, esta também foi incluída na figura 2 para auxiliar na interpretação dos dados.

(continua)

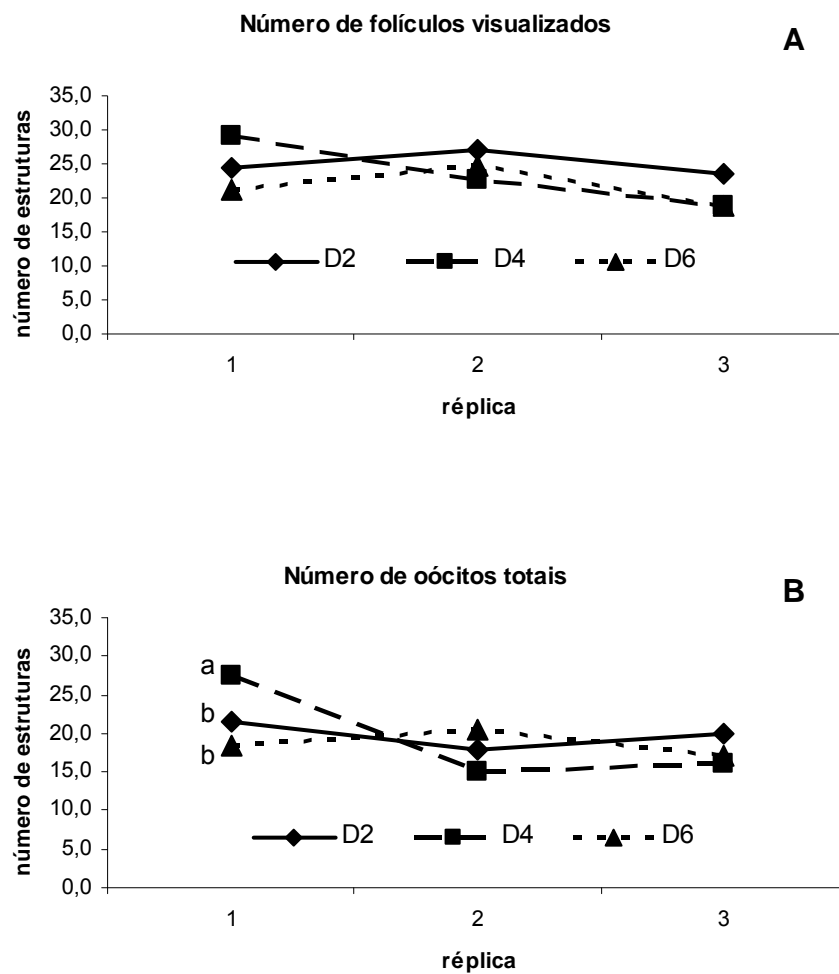


Figura 2 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos grau 1 (C) e número de núcleos dos embriões eclodidos (D) – Cravinhos – SP – 2006

(conclusão)

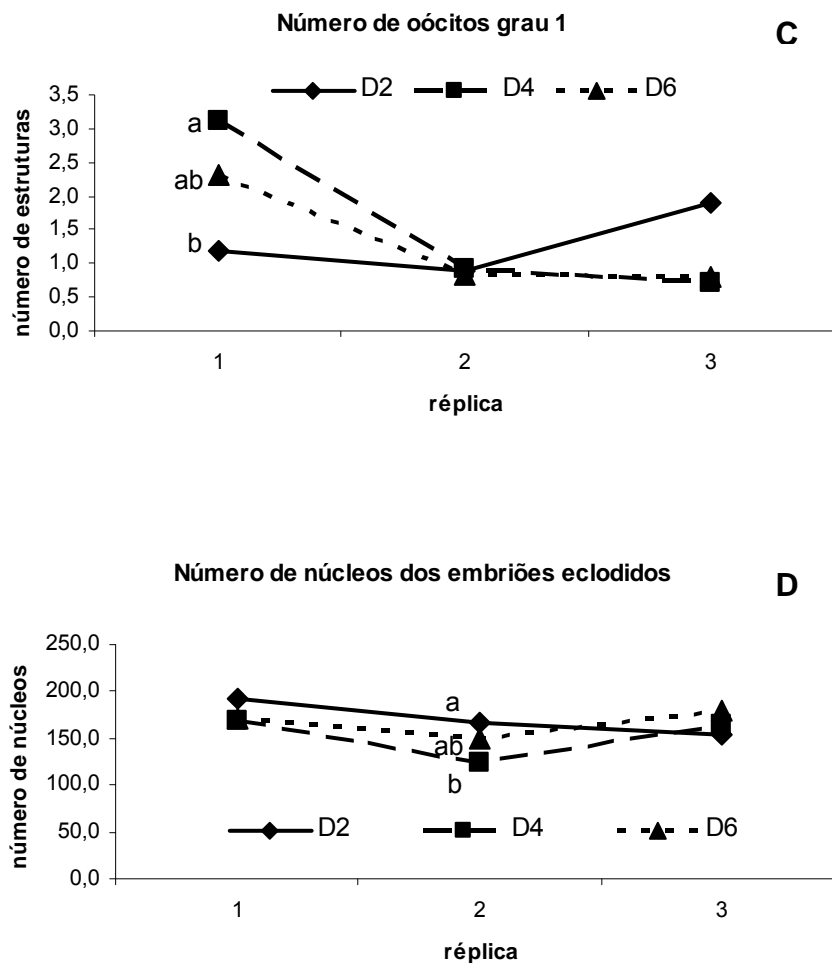


Figura 2 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos grau 1 (C) e número de núcleos dos embriões eclodidos (D) – Cravinhos – SP – 2006

O maior número de oócitos totais encontrado na primeira réplica para o grupo aspirado 4 dias após a emergência da onda de crescimento folicular em relação aos outros grupos parece ser reflexo do número de folículos visualizados, como se pode observar na figura 2A, embora esta variável não tenha sido significativa. De maneira similar, o maior número de oócitos grau 1 para o grupo D4 pode ser explicado pelo aumento no número de oócitos totais dos animais submetidos ao mesmo tratamento.

A aspiração realizada 4 dias após a emergência da onda de crescimento folicular representa a fase imediatamente após a seleção folicular, uma vez que a divergência folicular ocorre em média 2,8 dias após a emergência folicular em *Bos*

*taurus* (GINTHER et al., 1996) ou entre 2,5 e 2,7 dias após a ovulação em *Bos indicus* (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008). Estes dados corroboram com os achados de Nagano et al. (2007), que identificaram a fase de seleção folicular como a mais indicada para a OPU, devido ao maior número de folículos contendo oócitos de boa qualidade, em comparação às fases de recrutamento e de dominância. Apesar destes autores encontrarem aumento do número de folículos na fase de recrutamento, os oócitos deles provenientes apresentaram em sua maioria, baixa qualidade. Contudo, estes pesquisadores utilizaram como metodologia a dissecação de folículos ovarianos de vacas Holandesas *post mortem*, sem prévia sincronização da onda de crescimento folicular, fazendo distinção das fases somente pela presença/ ausência de folículos maiores do que 15 mm e/ ou CL. Não foram encontradas explicações plausíveis para a ocorrência deste efeito somente na primeira réplica do presente estudo.

Quanto ao número de núcleos dos embriões eclodidos, verificou-se maior contagem para o grupo submetido à OPU 2 dias após a emergência da onda de crescimento folicular na segunda réplica, sendo que o pior grupo foi aquele aspirado aos 4 dias. Até o presente momento, os estudos conduzidos para determinar a melhor fase da onda de crescimento folicular não disponibilizam dados sobre taxa de eclosão ou contagem de núcleos como medidas de qualidade embrionária. Apesar disso, sabe-se que ambas as variáveis estão relacionadas à qualidade dos oócitos que entram para a produção de embriões *in vitro*. Entretanto, não se verificou nem interação, nem efeito de momento da OPU para número ou taxa de oócitos viáveis, a despeito e, contraditoriamente ao resultado anterior, no qual maior número de oócitos de grau 1 foi encontrado para o grupo aspirado 4 dias após a emergência da onda de crescimento folicular na primeira réplica do presente estudo. Novamente não foram encontradas explicações para que este efeito tenha sido observado somente na segunda réplica. As diferenças entre os grupos para esta variável foram mantidas ao avaliar somente o efeito de tratamento, e serão comentadas mais adiante.

Quanto ao efeito principal de momento da aspiração em relação à fase da onda de crescimento folicular, somente três dentre todas as variáveis analisadas foram significativamente afetadas por este fator. A OPU realizada no D2 foi consistente em produzir melhores resultados de taxa de blastocistos 6 dias pós FIV, no número de blastocistos eclodidos 9 dias pós FIV e no número de núcleos dos

embriões eclodidos. Contudo, a OPU realizada no D6 também influenciou positivamente a taxa de blastocistos 6 dias pós FIV e não diferiu dos outros momentos com relação ao número de núcleos dos embriões eclodidos.

Os momentos de aspiração folicular do presente estudo não produziram diferenças nas variáveis relacionadas à recuperação de oócitos (número de folículos visualizados, número de oócitos totais e taxa de recuperação). Estes resultados corroboram com os obtidos por outros grupos de pesquisa, uma vez que as mesmas variáveis não foram afetadas pela fase do ciclo estral nem antes (dias 1 a 3 do ciclo; MACHATKOVÁ et al., 2000) nem após a seleção folicular (3, 5, 7 ou 9 dias após a emergência folicular; MELO, 2007). Ao que parece, há prejuízo no número de oócitos totais recuperados somente em fases mais tardias do ciclo (dias 15 e 16; MACHATKOVÁ et al., 2000), o que não ocorreu no presente estudo uma vez que períodos mais precoces da onda de crescimento folicular foram adotados.

Relativo à qualidade oocitária, todos os grupos do presente estudo se comportaram de forma semelhante, em concordância com outros trabalhos nos quais não foram encontradas diferenças no número de oócitos viáveis quando a OPU foi realizada entre os dias 1 e 3 do ciclo (MACHATKOVÁ et al., 2000) ou na porcentagem de oócitos saudáveis aspirados 2, 3, 5 e 7 dias após a emergência folicular (VASSENA et al., 2003), bem como no número e taxa de oócitos viáveis obtidos 3, 5, 7 ou 9 dias pós-emergência (MELO, 2007).

Quanto aos critérios relacionados à qualidade embrionária, não houve diferença entre tratamentos nem no número de embriões clivados, nem na taxa de clivagem, assim como descrito por Melo (2007) e Ramos et al. (2010). Entretanto, a OPU no D2 influenciou positivamente o desenvolvimento embrionário no presente estudo. Houve antecipação no desenvolvimento a blastocisto, fato observado pelo aumento na taxa destes embriões 6 dias pós-FIV. Este achado indica boa qualidade embrionária, apresentando reflexo no estágio seguinte, como verificado pelo aumento no número de blastocistos eclodidos 9 dias pós-FIV e na contagem de núcleos desta categoria de embriões. Do ponto de vista de cinética do desenvolvimento embrionário, relatos prévios demonstram que o tempo necessário para que um embrião atinja o estágio de blastocisto é mais importante para a avaliação de qualidade (mensurada pelo número de núcleos totais e da massa celular interna) do que a morfologia, clivagem ou mesmo a eclosão, uma vez que

embriões com desenvolvimento antecipado possuem maior número de núcleos (VAN SOOM; YSEBAERT; DE KRUIF, 1997).

O resultado obtido no presente estudo corrobora com outros trabalhos que reportaram melhor desempenho da OPU para a produção embrionária na fase de crescimento folicular (3 dias após a emergência folicular - MACHATKOVÁ et al., 2004) em comparação à fase de dominância (7 dias após a emergência folicular - MACHATKOVÁ et al., 2004). Outros autores demonstraram ainda que, as taxas de blastocisto são prejudicadas em fases tardias de dominância folicular (dia 8 do ciclo - HENDRIKSEN et al., 2000; dias 7 e 9 – MELO, 2007) frente a momentos anteriores (dias 2 e 5 - HENDRIKSEN et al., 2000; dias 3 e 5 – MELO, 2007). Com base nestas citações, pode-se verificar que oócitos recuperados quando a dominância está estabelecida (a partir de 7 dias após a emergência) apresentam menor potencial para a produção de embriões, e isto pode ser atribuído à presença do folículo dominante (HAGEMANN, 1999).

Contudo, o presente estudo entra em desacordo com o descrito por Vassena et al. (2003), que verificaram melhor taxa de blastocistos em vacas submetidas à aspiração folicular 5 dias após a emergência da onda de crescimento folicular em comparação com aquelas cuja OPU ocorreu aos 2, 3 ou 7 dias. Segundo os autores, este momento corresponde à fase estática tardia ou inicial de atresia folicular, coincidindo com o estágio no qual os oócitos colhidos apresentam melhor competência para o desenvolvimento embrionário, a despeito de uma possível alteração morfológica (HENDRIKSEN et al., 2000), confirmando ainda os dados de outro grupo de pesquisa (SALAMONE; ADAMS; MAPLETOFT, 1999) que verificou melhoria na produção de blastocistos expandidos e eclodidos quando os oócitos foram colhidos nesta mesma fase em relação à de crescimento.

No presente estudo, a aspiração folicular no D2 favoreceu a produção embrionária somente a partir do 6º dia pós-FIV, ou seja, após a fase de bloqueio materno-zigótico. Deste modo, pode-se pressupor que as reservas citoplasmáticas acumuladas no oócito até este momento não foram influenciadas pela fase da onda de crescimento folicular, uma vez que não foram detectadas diferenças entre os tratamentos até a clivagem. Aparentemente, devem haver outros fatores produzidos pelo oócito e/ou cumulus que suportem o desenvolvimento além desse estágio, afetados de acordo com o período da nova onda de crescimento folicular. Embasando este raciocínio, Ghanem et al. (2007) desenvolveram um experimento

no qual foram identificados transcritos relacionados à competência de oócitos provenientes de folículos subordinados nas fases de crescimento (3 dias após o estro) e de dominância (7 dias após o estro). Verificou-se que 51 transcritos foram diferencialmente regulados em oócitos colhidos nestas fases do ciclo, sendo que na fase de crescimento grande parte deles estavam relacionados à síntese protéica em comparação à fase de dominância. Esta atividade de síntese é importante para o crescimento do oócito e desenvolvimento embrionário, sendo um indicador de competência. Por outro lado, os oócitos oriundos da fase de dominância apresentaram transcritos relacionados à diferenciação no desenvolvimento embrionário precoce e à apoptose, possivelmente devido à atresia dos folículos subordinados induzida pelo folículo dominante. Neste estudo, os autores sugerem que os transcritos MSX1 e RPL24 sejam utilizados como marcadores de competência, uma vez que o primeiro foi encontrado tanto em oócitos quanto em células do cumulus de folículos subordinados na fase de dominância, e o segundo em oócitos obtidos na fase de crescimento. Em outro trabalho (NEMCOVA et al., 2006), a expressão de genes relacionados à apoptose (Bax) e às conexões celulares (Cx31 e Cx43) em oócitos colhidos de folículos pequenos (2 a 5 mm) e médios (6 a 10 mm) durante as fases de crescimento e de dominância foi investigada. Houve maior expressão apenas do gene Cx43 em blastocistos aos 8 dias pós-FIV oriundos de oócitos recuperados na fase de crescimento em comparação à fase de dominância, independentemente do diâmetro folicular.

Ao analisar globalmente os resultados do presente experimento, verifica-se certa discrepância entre as variáveis que apresentaram interação entre momento da OPU e réplica (número de oócitos totais, número de oócitos grau 1 e número de núcleos dos embriões eclodidos) e aquelas nas quais se identificou apenas o efeito do momento da OPU (taxa de blastocistos 6 dias após a FIV, número de blastocistos eclodidos e número de núcleos dos embriões eclodidos). Uma vez que apenas três réplicas foram realizadas neste estudo-piloto, talvez seja mais apropriado considerar as variáveis cujo tratamento exerceu efeito em todas do que apenas em uma delas, principalmente porque nesses casos não foram encontradas explicações que justificassem os achados. Deste modo, é possível que a fase da onda de crescimento folicular, no caso previamente à seleção do folículo dominante, esteja interferindo na foliculogênese e na oogênese via expressão de genes que são importantes para a aquisição de competência embrionária. Novos estudos são

necessários para a identificação de outros possíveis genes candidatos e os mecanismos pelos quais exercem suas funções biológicas.



#### 4 CONCLUSÕES

- A taxa de recuperação de oócitos não foi afetada pela aspiração realizada 2, 4 ou 6 dias após a emergência folicular em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*);
- Não houve influência do momento de aspiração folicular sobre a qualidade de oócitos de novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*);
- Foram produzidos maior taxa de blastocistos aos 6 dias pós-FIV, bem como maior número de blastocistos aos 9 dias pós-FIV e maior número de núcleos dos embriões eclodidos quando procedeu-se com aspiração 2 dias após a emergência folicular em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Contudo, a OPU realizada no D6 também influenciou positivamente a taxa de blastocistos 6 dias pós FIV e não diferiu dos outros momentos com relação ao número de núcleos dos embriões eclodidos. Não houve efeito de momento de aspiração sobre as taxas de clivagem, de blastocistos aos 7 e 9 dias pós-FIV e de eclosão.

## *CAPÍTULO II*

*Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular*

## **EXPERIMENTO 1 - DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS ZEBUÍNAS, TAURINAS E BUBALINAS TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET ASSOCIADO OU NÃO À PROGESTERONA INJETÁVEL**

### **1 JUSTIFICATIVA**

O presente experimento foi o segundo piloto do projeto de Doutorado. Embora os momentos de emergência folicular em fêmeas Nelore e Holandesas sincronizadas tenham sido relatados em trabalhos prévios, tal informação não estava disponível na literatura para a espécie bubalina. Deste modo, o presente estudo foi conduzido a fim de determinar o dia da emergência folicular nos três grupos genéticos em condições contemporâneas de manejo e nutrição.

## **2 HIPÓTESE**

A associação de benzoato de estradiol com progesterona injetável promove menor dispersão da emergência da onda de crescimento folicular em relação à administração do benzoato de estradiol isoladamente, em novilhas Nelore, Holandesas e bubalinas.

### **3 OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da progesterona injetável na sincronização de emergência folicular e determinar o dia da emergência folicular em novilhas Nelore, Holandesas e bubalinas submetidas a protocolo de sincronização à base de progestágeno associado ao estradiol.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O presente estudo foi realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus administrativo de Pirassununga.

Foram utilizadas dez novilhas da raça Nelore, dez novilhas da raça Holandesa e dez novilhas bubalinas cruzadas (Murrah x Mediterrâneo), com idades ao redor de 2 anos e condição corporal  $\geq 3,0$ .

Todos os animais foram mantidos em piquetes pertencentes ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, com alimentação à base de silagem de milho, concentrado à base de soja e milho, sal mineral (Fosbovi Reprodução® e Núcleo Reprodução Boi Verde®, Tortuga Cia Zootécnica Agrária) e água *ad libitum*.

### 4.2 SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DINÂMICA FOLICULAR

Em dia aleatório do ciclo estral todos os animais receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet Schering-Plough) e foram então divididos em dois grupos para receber os seguintes tratamentos: 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Intervet Schering-Plough) ou 2mg de benzoato de estradiol associado a 50 mg de progesterona injetável (BE + P4; Progesterona Inyectable Oleosa 20 mg/ml®, Syntex, Argentina). Oito dias depois do início do protocolo hormonal os implantes foram removidos e uma dose de 150µg de d-cloprostenol (Preloban®, Intervet Schering-Plough) foi administrada. Após 48 horas todos os animais receberam uma dose de 50 µg de gonadorelina (Gestran Plus®, Tecnopec; figura 1).

A dinâmica folicular de todas as novilhas foi realizada por ultrassonografia transretal (Aloka 900, Tóquio, Japão) a cada 24 horas até a retirada do implante auricular. Após a administração do indutor de ovulação os exames foram realizados a cada 12 horas por um período adicional de 48 horas (figura 1). A ovulação foi considerada a média do momento no qual o folículo dominante desapareceu do ovário e o momento anterior.

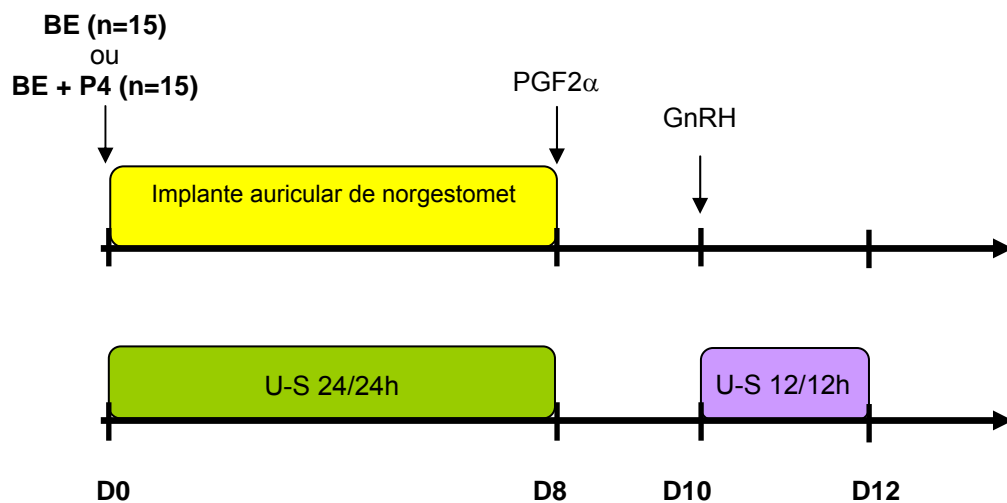


Figura 1 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e dos exames ultrassonográficos de novilhas Nelore (n=10), Holandesas (n=10) e bubalinas (n=10) submetidas a tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona injetável (BE + P4) – Pirassununga – SP – 2008

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis-resposta: diâmetro do CL e do folículo de maior diâmetro no início do protocolo hormonal, momento da emergência folicular, número de folículos na emergência folicular, diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do implante auricular, diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação e momento da ovulação após a remoção do implante auricular foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Os dados foram analisados por regressão logística no PROC GLIMMIX do SAS, considerando o arranjo fatorial dos tratamentos em: grupo genético (Nelore, Holandês ou Búfalo),

tratamento para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular (benzoato de estradiol ou benzoato de estradiol associado à progesterona) e interação entre os dois fatores. A dispersão da emergência foi verificada pelo teste de Bartlett. Considerou-se significância quando  $P < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dinâmica folicular durante os tratamentos para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular está representada na figura 2.

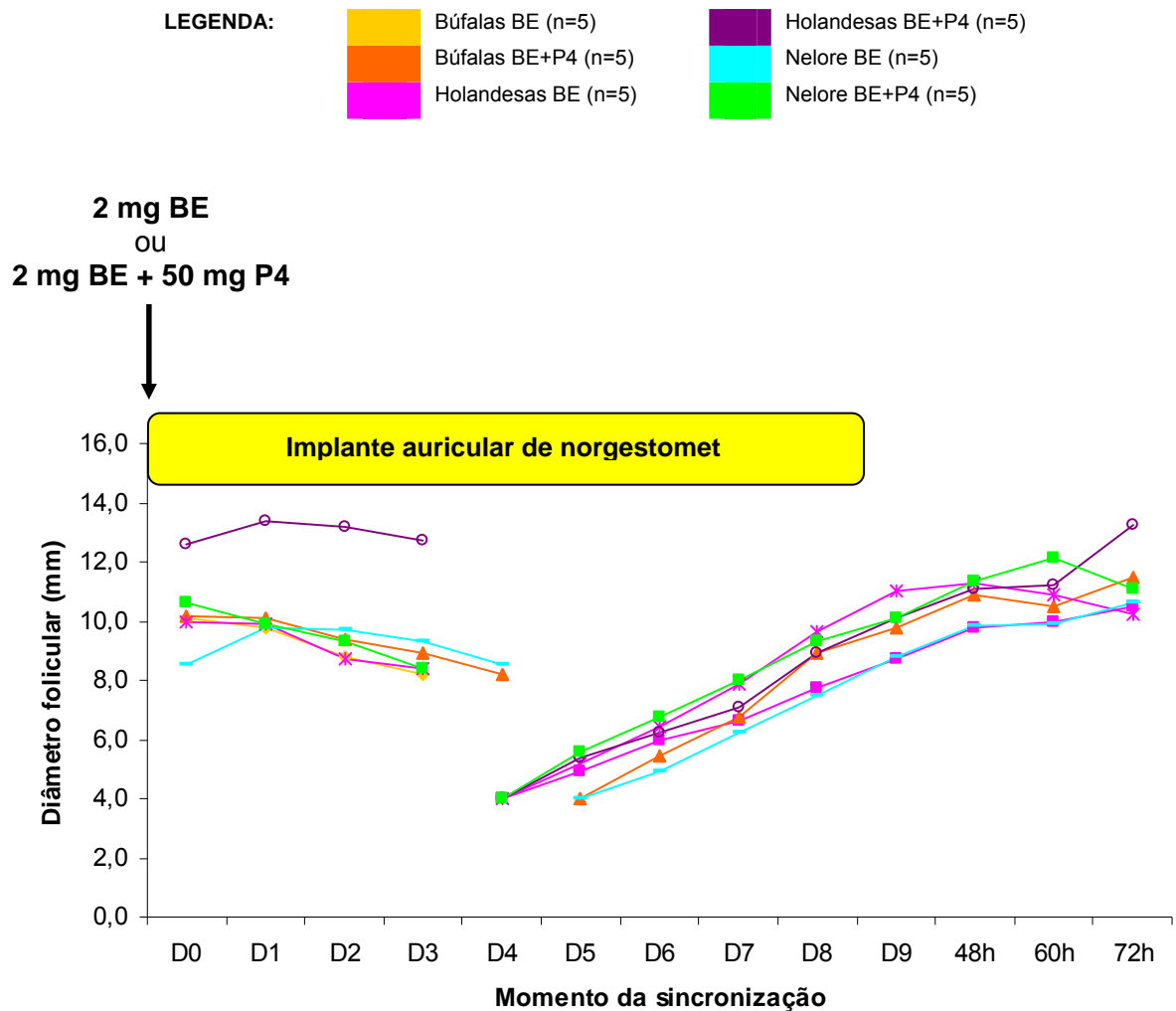


Figura 2 - Dinâmica folicular de novilhas Nelore (n=10), Holandesas (n=10) e bubalinas (n=10) tratadas com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona injetável (BE + P4) no início do protocolo de sincronização – Pirassununga – SP – 2008

Os dados obtidos e os valores de P para os efeitos de grupo genético, tratamento para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e interação entre estes fatores estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona (BE+P4) em protocolos de sincronização de novilhas Nelore, Holandesas e Bubalinas (GERAL). Pirassununga – SP, 2008

	NELORE		HOLANDESA		BUFALO		Tratamento	Valor de P	
	BE (n=5)	BE+P4 (n=5)	BE (n=5)	BE+P4 (n=5)	BE (n=5)	BE+P4 (n=5)		Grupo Genético	Interação
Número de animais com CL no início do protocolo	4	4	5	3	5	4	-	-	-
Diâmetro do CL no início do protocolo (mm)	16,4±1,9	19,0±4,3	18,3±3,1	27,5±4,8	19,1±1,7	18,9±1,5	0,13	0,23	0,29
Diâmetro do folículo dominante no início do protocolo (mm)	9,6±1,3	10,0±1,0	10,1±1,8	14,4±2,4	11,2±0,9	10,5±0,7	0,28	0,27	0,22
Emergência folicular (dias)	4,6±0,2	3,8±0,2	4,4±0,2	4,4±0,2	4,4±0,4	4,6±0,2	0,37	0,54	0,17
Número de folículos na emergência	30,0±5,2	29,4±4,2	12,8±3,0	17,2±4,8	13,0±2,2	13,2±1,9	0,67	<0,01	0,78
Diâmetro do folículo dominante na retirada do implante (mm)	8,1±1,3	9,3±0,8	8,8±0,6	8,4±1,1	7,0±0,8	8,9±1,2	0,27	0,71	0,49
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	12,0±1,8	12,4±1,5	11,2±0,6	11,0±1,0	13,0±2,0	12,2±1,3	0,84	0,49	0,91
Taxa de ovulação (%)	60,0±24,5	80,0±20,0	100,0±0,0	80,0±20,0	40,0±24,5	60,0±24,5	0,70	0,18	0,55
Momento da ovulação após a retirada do implante (horas)	78,0±0,0	81,0±3,0	78,0±3,8	75,0±3,0	84,0±6,0	78,0±6,9	0,57	0,55	0,59

Não houve interação e, portanto, os dados estão apresentados de acordo com os efeitos principais de grupo genético e de tratamento para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular (tabela 2 e figura 3).

Tabela 2 - Efeitos do tratamento com benzoato de estradiol (BE) ou benzoato de estradiol associado à progesterona (BE+P4) em protocolos de sincronização de novilhas Nelore, Holandesas e Bubalinas (EFEITOS PRINCIPAIS) – Pirassununga – SP – 2008

	BE (n=15)	BE+P4 (n=15)	NELORE (n=10)	HOLANDESA (n=10)	BUFALO (n=10)
Número de animais com CL no início do protocolo	14	11	13	13	14
Diâmetro do CL no início do protocolo (mm)	18,0±1,3	21,3±2,2	17,7±2,2	21,8±3,0	19,0±1,1
Diâmetro do folículo dominante no início do protocolo (mm)	10,3±0,8	11,7±1,0	9,8±0,8	12,3±1,6	10,9±0,6
Emergência folicular (dias)	4,5±0,2	4,3±0,2	4,2±0,2	4,4±0,2	4,5±0,2
Número de folículos na emergência	18,6±2,9	19,9±2,8	29,7 <sup>a</sup> ±3,1	15,0 <sup>b</sup> ±2,8	13,1 <sup>b</sup> ±1,4
Diâmetro do folículo dominante na retirada do implante (mm)	8,0±0,5	8,9±0,6	8,7±0,7	8,6±0,6	8,0±0,7
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	11,8±0,7	11,8±0,7	12,2±1,0	11,1±0,5	12,5±1,0
Taxa de ovulação (%)	66,7±12,6	73,3±11,8	70,0±15,3	90,0±10,0	50,0±16,7
Momento da ovulação após a retirada do implante (horas)	79,2±2,2	78,0±2,3	79,7±1,7	76,7±2,4	80,4±4,5

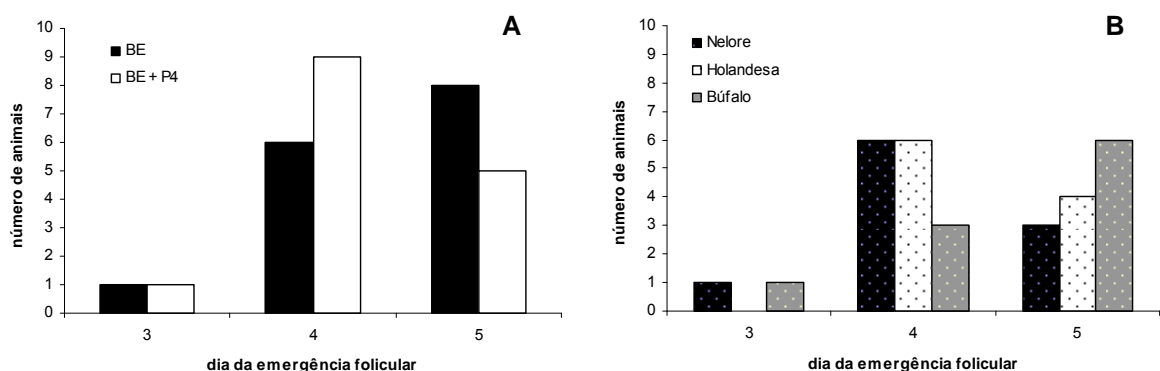


Figura 3 - Dispersão da emergência da onda de crescimento folicular de acordo com os efeitos principais de tratamento para sincronização (A; BE: n = 15 e BE + P4: n = 15) ou de grupo genético (B; Nelore: n = 10, Holandesas: n=10 e bubalinas: n=10) – Pirassununga – SP – 2008

A adição de progesterona no início do protocolo não melhorou a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular em nenhum dos grupos genéticos avaliados, contrariamente ao esperado. Os resultados obtidos no presente estudo não confirmam os obtidos por Martins et al. (2005) em vacas Nelore. Ao utilizar progesterona injetável associada ao benzoato de estradiol no início do protocolo de sincronização com dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado, os autores observaram que houve atraso no dia da emergência ( $4,2 \pm 0,08^{a,y}$ ), porém melhor sincronização, em comparação aos outros grupos (grupo dispositivo novo sem progesterona injetável:  $3,1 \pm 0,22^{b,x}$  e grupo dispositivo intravaginal previamente utilizado sem progesterona injetável:  $2,8 \pm 0,22^{b,x}$ ). Também não corroboram com estudo conduzido em vacas cruzadas de corte (MORENO et al., 2001). A adição de progesterona injetável ao protocolo de sincronização de emergência folicular promoveu menor dispersão do que o tratamento apenas com benzoato de estradiol ( $4,0 \pm 0,2$  vs.  $4,0 \pm 1,3$ , respectivamente).

Contudo, esta associação de hormônios ainda mostra-se controversa. Em recente estudo realizado em novilhas, vacas secas e vacas em pico de lactação da raça Holandesa, não houve diferença na emergência folicular entre animais tratados ou não com a progesterona injetável em protocolos à base de implante auricular de norgestomet (FERREIRA et al., 2009;  $3,9 \pm 0,1$  vs.  $3,6 \pm 0,2$ , respectivamente). Adicionalmente, em outro estudo no qual foi utilizado implante auricular de norgestomet em vacas Holandesas, não houve diferença entre o grupo tratado com valerato de estradiol e norgestomet injetável ( $4,8 \pm 1,1$  dias) em relação aos tratados com benzoato de estradiol associados a 100 mg progesterona (2mg BE:  $4,0 \pm 0,8$ ; 3 mg BE:  $3,7 \pm 0,8$  e 4 mg:  $3,8 \pm 1,0$  dias; RODRIGUES et al., 2003). Por fim, em experimento conduzido em vacas Nelore submetidas a tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona, a adição de progesterona injetável ao protocolo não influenciou o momento e nem a dispersão da emergência folicular (BE:  $4,0 \pm 0,1$  vs. BE+P4:  $3,6 \pm 0,2$  dias; MARTINS et al., 2005), corroborando com o presente experimento.

No presente experimento não se verificou a necessidade de utilizar a progesterona injetável associada ao benzoato de estradiol para a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular em protocolos à base de

progestágenos. Contudo, é importante verificar que a maior parte dos animais apresentava CL no início do tratamento hormonal e que não se sabe o comportamento desta associação de fármacos em animais não cíclicos na fase folicular do ciclo estral, condição que se sucede em programas contínuos de aspiração folicular, conforme relatado em outros estudos (KRUIP et al., 1994; BONI et al., 1997).

## 6 CONCLUSÕES

- A administração de progesterona injetável ao protocolo de sincronização à base de benzoato de estradiol e implante auricular de norgestomet não alterou a dispersão do momento de emergência da nova onda de crescimento folicular em novilhas Nelore, Holandesas e bubalinas cíclicas;
- O momento da emergência folicular não diferiu entre os grupos genéticos, ocorrendo entre 4,2 a 4,5 dias após o início do protocolo de sincronização.

## EXPERIMENTO 2 - TAXA DE RECUPERAÇÃO *IN VIVO* E COMPETÊNCIA *IN VITRO* DE OÓCITOS BUBALINOS, ZEBUÍNOS E TAURINOS ASPIRADOS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

### 7 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 7.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O presente estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), campus administrativo de Pirassununga – SP, de julho a outubro de 2008. Para tanto, foram utilizados os mesmos animais descritos no Experimento 1 deste Capítulo, empregando, porém, nove novilhas de cada grupo genético.

Todos os animais foram mantidos em piquetes pertencentes ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, com alimentação à base de silagem de milho, concentrado à base de soja e milho, sal mineral (Fosbovi Reprodução® e Núcleo Reprodução Boi Verde®, Tortuga Cia Zootécnica Agrária) e água *ad libitum*, tendo sido submetidos a período de adaptação um mês antes do início do estudo. O período experimental foi escolhido em função da sazonalidade das fêmeas bubalinas. Em decorrência de ser a época do ano com pior qualidade de pastagem, houve a necessidade de que toda a alimentação fosse fornecida no cocho.

#### 7.2 SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

A emergência da onda de crescimento folicular foi sincronizada em todos os animais por meio do tratamento hormonal esquematizado na figura 4. Em dia aleatório do ciclo estral foi inserido um implante auricular de norgestomet (Crestar®,

Intervet Schering-Plough), associado a 2mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®, Syntex) com 50mg de progesterona injetável (Progesterona Inyectable, Syntex). A fim de eliminar a maioria dos corpos lúteos, uma dose de PGF2 $\alpha$  (150 $\mu$ g de d-cloprostenol; Preloban®, Intervet Schering-Plough) também foi administrada neste mesmo dia. A emergência da nova onda de crescimento folicular foi considerada como D0, sendo os períodos adotados no presente estudo D1, D3 e D5. O período de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona foi de 5, 7 ou 9 dias, uma vez que no Experimento 1 deste Capítulo, o momento esperado da emergência da nova onda folicular foi ao redor de quatro dias após o início do protocolo (variação de 3,8 a 4,6 dias).

Todos os animais passaram por todos os momentos de sincronização, em delineamento experimental alternado (“cross-over”), realizado em seis réplicas, com intervalos de aspiração folicular a cada 14 dias. Assim como descrito no Capítulo 1, os momentos de sincronização da emergência folicular foram distintos, porém o dia de aspiração folicular foi o mesmo para todos os grupos a cada réplica (figura 4).



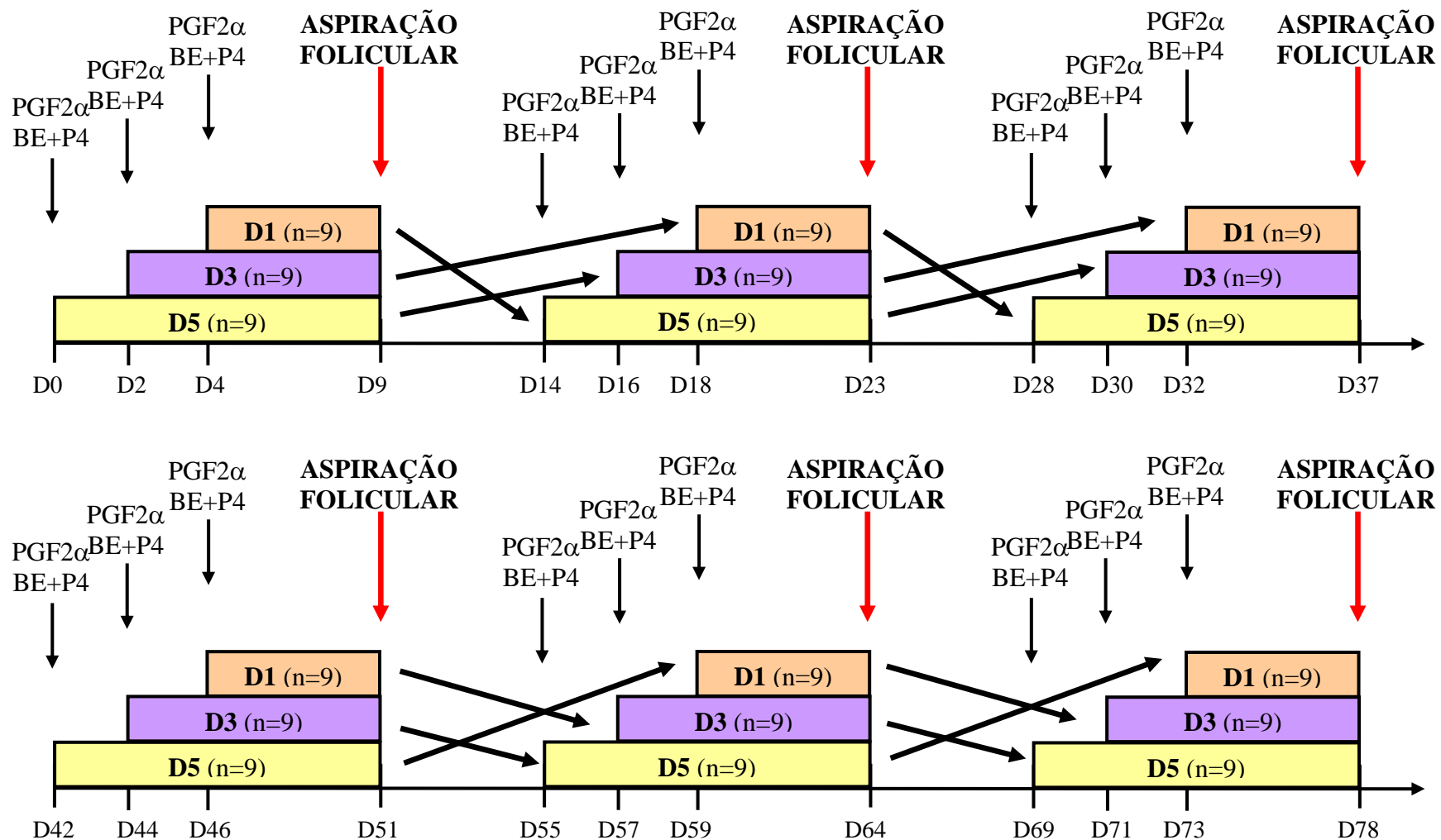


Figura 4 - Representação do delineamento experimental alternado (“cross-over”) – Pirassununga – SP – 2008. Nota: para cada momento de sincronização, há 3 novilhas Bubalinas, 3 Holandesas e 3 Nelore.

### 7.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA (OPU)

Os animais foram contidos em brete localizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), campus de Pirassununga - SP, e submetidos à anestesia epidural, realizada no espaço entre a última vértebra sacral e primeira coccígea, utilizando para bovinos volume de 4,0 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Lidovet®, Bravet) e para bubalinos, 3,0 mL. Após a perda dos reflexos da cauda, esta foi presa e procedeu-se a remoção manual das fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal com água. A vulva também foi cuidadosamente higienizada, tomando-se o cuidado de não permitir a entrada de água dentro do canal vaginal.

Previamente às aspirações, os folículos de ambos ovários foram contados através de ultra-sonografia transvaginal (Aloka 500; sonda microconvexa - frequência 5 MHz). As punções foliculares foram realizadas com o mesmo aparelho acoplado a um sistema com cateter descartável 48x17mm (16G; Angiocath®, B-D) e linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada). A pressão na bomba de vácuo estava entre 12 a 15 mL de água/ minuto (65 a 70 mmHg). O sistema de aspiração foi lavado com solução fisiológica 0,9% adicionada de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina – Anexo A), heparina sódica (5000UI/ L; Parinex®, Hypolabor), 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). Esta solução, aquecida a 37 °C, foi a mesma empregada para colher os oócitos aspirados. Os folículos visíveis ( $\geq 2$ mm) foram puncionados e o fluido contendo os oócitos foi colhido em tubo cônico de 50 mL (Corning).

Após a aspiração, o tubo com o conteúdo aspirado foi despejado em filtro de colheita de embriões (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada) e lavado com o mesmo meio descrito anteriormente até obtenção de um líquido translúcido, com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de Petri para observação em lupa estéreomicroscópica e realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos complexos *Cumulus*-oócitos (CCOs). Foram

considerados viáveis os oócitos de graus I a III, conforme descrito anteriormente no Experimento 1.

Os oócitos viáveis foram envasados em criotubos de 1,2 mL (Corning) contendo meio de lavagem de oócitos (H199; Anexo B), e mantidos em garrafa térmica a 35°C, até a chegada ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), campus Pirassununga. O tempo de transporte ao laboratório foi de no máximo 2 horas a partir do início da aspiração folicular de cada grupo genético.

## 7.4 PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIV)

### 7.4.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Ao chegar ao laboratório, o conteúdo do criotubo foi vertido em placa de Petri pequena, onde os CCOs foram novamente procurados e, posteriormente, lavados uma vez em gotas de 200  $\mu$ L de meio de maturação (B199 suplementado; Anexo F).

No presente experimento, o meio de maturação foi suplementado com antioxidantes (50  $\mu$ M de cisteamina e 0,3 mM de cistina), em função da grande quantidade de lipídeos encontrados no citoplasma dos oócitos bubalinos (GASPARRINI, 2002). De modo a haver igualdade de condições em todos os grupos genéticos, o mesmo meio empregado em bubalinos, foi utilizado em bovinos.

Após a lavagem dos oócitos, estes foram depositados em placa de Petri contendo gotas de B199 suplementado, cobertas com óleo mineral estéril. Foram adotados dois tamanhos de gota, em função da média de oócitos obtida por grupo genético, como demonstrado na seção Resultados. No entanto, a proporção de estruturas/  $\mu$ L de meio foi semelhante independentemente do volume da gota. Para novilhas Holandesas e Bubalinas, foram utilizadas gotas de 50  $\mu$ L com proporção de 10 a 15 oócitos por gota, ao passo que para as novilhas Nelore, as gotas foram de 90  $\mu$ L com média de 20 a 30 oócitos. Cada momento em relação à emergência folicular (D1,

D3 e D5) foi correspondente a uma placa, sendo as mesmas separadas também de acordo com o grupo genético. Cada gota apresentava os oócitos de um animal (unidade experimental), a menos que o número de oócitos ultrapassasse o limite máximo por gota. As placas foram levadas à estufa durante 24 horas (contadas a partir do momento da aspiração folicular), a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada.

#### **7.4.2 Fecundação *in vitro* (FIV)**

Uma hora antes do término do período de maturação, o sêmen (de um único touro e partida Nelore ou búfalo) foi selecionado pelo método de gradiente de Percoll (45 e 90%; Anexo D). Uma palheta de 0,25 mL foi descongelada a 37°C durante 30 segundos, e seu conteúdo foi depositado cuidadosamente sobre o gradiente de Percoll, para posterior centrifugação a 1300 rpm (Baby Fanen®, Fanen) durante 30 minutos. O pellet formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll, e seu volume foi calculado. Cinco µL deste pellet foram colocados em ependorf com 250 µL de água, para avaliação de concentração em Câmara de Neubauer, e outros cinco µL foram depositados em ependorf com 250 µL de meio FIV (Anexo E), para observação de motilidade em microscópio óptico. A partir destes dados, foi realizado o cálculo para a diluição do sêmen em meio FIV, de modo que a dose inseminante foi de 2 milhões de espermatozóides/ mL.

Durante a centrifugação do sêmen, a placa de maturação foi retirada da estufa para lavagem dos COCs em gotas de 200 µL de meio FIV, e os oócitos foram transferidos para a placa de FIV. O volume das gotas foi ajustado como descrito no item 1.3.1. Em seguida, a dose inseminante foi depositada em cada gota, e as placas de FIV foram deixadas na estufa durante aproximadamente 20 horas, sob as mesmas condições de atmosfera, umidade e temperatura empregadas para a MIV.

### **7.4.3 Cultivo *in vitro***

Após o período de fecundação, as estruturas foram transferidas para placa contendo gotas de 100  $\mu\text{L}$  de hialuronidase 2% (Anexo G), onde foram desnudadas com auxílio de pipeta calibrada em 75  $\mu\text{L}$ , para retirada total das células do *Cumulus*. Após o total desnudamento dos presumíveis zigotos, estes foram lavados uma vez em gota de 150  $\mu\text{L}$  de H199 e uma vez em gota de 100  $\mu\text{L}$  de meio SOF (Anexo H). As placas empregadas na MIV, as quais continham uma monocamada de células do *Cumulus* no fundo de cada gota, foram reutilizadas no CIV (sistema de co-cultivo). Procedeu-se com a remoção do meio de maturação e substituição por meio de cultivo, após duas lavagens prévias com SOF. Posteriormente, 20 a 30 ou 10 a 15 presumíveis zigotos foram transferidos para as placas de CIV contendo gotas de 90 ou 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente, as quais foram mantidas a 38,5°C com 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e umidade saturada.

### **7.4.4 “Feeding” e avaliação da taxa de clivagem**

Após 72 horas da fecundação, 1/3 do meio de cultivo antigo foi removido e substituído por 1/3 de SOF fresco. Nesse momento foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões.

### **7.4.5 Avaliação da taxa de blastocistos**

No 7º dia após a fecundação, os embriões foram avaliados morfológicamente e classificados de acordo com os padrões da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

#### 7.4.6 Avaliação da taxa de eclosão e contagem de núcleos

A taxa de eclosão foi verificada 9 dias após a FIV. Dos embriões eclodidos, 50% foram aleatoriamente fixados em solução de paraformaldeído 2%, e permaneceram refrigerados (4°C) até a montagem das lâminas para a contagem de núcleos. Para esta finalidade, os embriões foram mantidos durante 5 minutos em solução de Hoescht 33342/ PBS (1:10). Após este período, os embriões foram lavados em PBS, e em seguida colocados sobre lâmina contendo uma gota de 5 µL de Vectashield® (Vector Labs, EUA), respeitando-se o número de 5-10 embriões por lâmina. Rapidamente a lâmina foi coberta com uma lamínula, e a quantificação de núcleos foi realizada em microscópio de epifluorescência.

#### 7.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis-resposta: número de folículos visualizados, número de oócitos recuperados, taxa de recuperação (número de oócitos totais/ número de folículos visualizados), graus de qualidade oocitária, taxa de oócitos viáveis (número de oócitos de graus 1 a 3/ número de oócitos totais), número de oócitos que entraram para o cultivo *in vitro*, taxa de oócitos no CIV, número de estruturas clivadas, taxa de clivagem (número de estruturas clivadas/ número de oócitos que entraram para o CIV), número de blastocistos no D7, taxa de blastocistos no D7 (número de blastocistos no D7/ número de oócitos que entraram no CIV), número de blastocistos eclodidos no D9 e taxa de eclosão no D9 (número de blastocistos eclodidos no D9/ número de blastocistos no D7), foram analisadas através de ajustes de modelos lineares mistos (PROC MIXED do programa SAS for Windows 2000). Foram considerados no modelo estatístico, o grupo genético (Búfala, Nelore e Holandesa), o momento de aspiração (D1, D3 e D5), a réplica, e as interações entre estes fatores. O efeito de animal foi incluído no modelo como fator de efeito aleatório.

A variável número de núcleos dos embriões eclodidos foi analisada pelo modelo linear generalizado (PROC GLM do programa SAS for Windows 2000), pois os fatores réplica e animal não foram incluídos no modelo, um vez que devido ao pequeno número de embriões eclodidos estes foram armazenados juntos, independentemente da réplica, de acordo com o momento da OPU e o grupo genético.

A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias dos dados foram verificadas. A maior parte das variáveis não atendeu às premissas e para tanto, foram transformadas (raiz quadrada para contagens e arco seno para a raiz quadrada das proporções – as taxas foram expressas em termos de proporções). Quando houve efeito significativo da variável, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, considerando-se significância quando  $P < 0,05$ .

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a execução do presente estudo ocorreram alguns problemas de ordem técnica, como descrito a seguir.

A 1ª réplica foi inteiramente descartada, pois houve lise das estruturas ao se realizar o feeding. Deste modo, foi necessária a realização de uma sétima réplica ao final de todas as outras para o balanceamento da primeira tréplica do cross-over.

É importante salientar que houve contaminação de algumas gotas na 2ª (Nelore D1 e Búfalo D5) e 3ª réplicas (Nelore D3, Nelore D5 e Búfalo D5). Em alguns casos, a contaminação foi observada ao término do período de maturação, e em outros, na avaliação de clivagem. Nesses casos, os dados foram excluídos da análise estatística. O problema foi corrigido com a substituição do antibiótico empregado (de gentamicina para amicacina).

Adicionalmente, foram verificadas perdas de estruturas ao longo das etapas da produção *in vitro*, para efeito principal de grupo genético (tabela 6). Isto foi observado principalmente durante o CIV, na fase de pipetagem para o desnudamento dos presumíveis zigotos, momento no qual houve ruptura da zona pelúcida de algumas estruturas. Por esta razão, os cálculos subseqüentes à clivagem (taxa de clivagem e taxa de blastocistos no D7) foram realizados com base no número de estruturas no CIV, e não com base no número de estruturas viáveis.

Não houve interação tripla (grupo genético x momento da OPU x réplica), nem interações duplas entre momento da OPU x réplica e entre grupo genético x momento da OPU ( $P > 0,05$ ; tabelas 3 e 4). Contudo, houve interação entre grupo genético e réplica para as variáveis ilustradas na figura 5 (A a G). Os efeitos principais de grupo genético e momento da OPU serão apresentados nas tabelas 5 e 6 e discutidos a seguir.



Tabela 3 - Valores de P para efeitos principais de grupo genético, momento da OPU e réplica e interações entre estes fatores – Pirassununga – SP – 2008

	VALORES DE P						
	Grupo genético (GEN)	Momento OPU (DIA)	Réplica (REPL)	GEN*DIA	GEN*REPL	DIA*REPL	GEN*DIA*REPL
Número de folículos visualizados	< 0,01	0,82	0,08	0,88	<0,01	0,93	0,99
Número de oócitos totais	<0,01	0,56	0,05	0,90	0,03	0,37	0,39
Taxa de recuperação (%)	0,07	0,41	0,52	0,30	0,64	0,49	0,23
Número de oócitos viáveis	< 0,01	0,12	0,01	0,38	<0,01	0,13	0,45
Taxa de oócitos viáveis (%)	0,01	0,67	0,01	0,15	<0,01	0,25	0,29
Número de estruturas no CIV	<0,01	0,06	0,01	0,46	<0,01	0,16	0,44
Taxa de oócitos no CIV (%)	0,01	0,48	0,01	0,38	0,05	0,28	0,45
Número de estruturas clivadas	<0,01	0,15	0,02	0,68	<0,01	0,53	0,45
Taxa de clivagem (%)	0,02	0,62	<0,01	0,65	0,01	0,62	0,06
Número de blastocistos no D7	<0,01	0,76	<0,01	0,62	0,28	0,37	0,48
Taxa de blastocistos (%)	<0,01	0,36	<0,01	0,56	0,36	0,32	0,68
Número de blastocistos eclodidos	<0,01	0,56	0,01	0,62	0,20	0,69	0,85
Taxa de eclosão (%)	0,13	0,68	0,02	0,66	0,15	0,76	0,94
Número de núcleos dos embriões eclodidos	0,35	0,35	-	0,11	-	-	-

Tabela 4 - Variáveis de OPU - PIV realizada em 1, 3 ou 5 dias após a emergência folicular (D1, D3 ou D5, respectivamente), em novilhas Nelore, Holandesa ou Búfala (NEL, HOL ou BUF, respectivamente; média  $\pm$  PM) – Pirassununga – SP – 2008

	D1			D3			D5		
	NEL	HOL	BUF	NEL	HOL	BUF	NEL	HOL	BUF
<b>Número de folículos visualizados</b>	38,8 $\pm$ 3,0	23,1 $\pm$ 2,6	18,1 $\pm$ 1,4	42,2 $\pm$ 4,4	21,7 $\pm$ 2,3	19,4 $\pm$ 1,5	42,0 $\pm$ 3,6	21,5 $\pm$ 2,2	18,8 $\pm$ 1,6
<b>Número de oócitos totais</b>	35,2 $\pm$ 4,8	13,8 $\pm$ 1,8	14,7 $\pm$ 1,9	37,5 $\pm$ 4,4	16,2 $\pm$ 2,2	13,9 $\pm$ 1,6	38,5 $\pm$ 4,3	16,2 $\pm$ 2,3	15,7 $\pm$ 2,0
<b>Taxa de recuperação (%)</b>	79,5 $\pm$ 4,7	57,3 $\pm$ 4,5	74,8 $\pm$ 5,4	83,4 $\pm$ 3,8	73,4 $\pm$ 4,5	68,4 $\pm$ 6,9	83,9 $\pm$ 4,4	69,6 $\pm$ 4,7	74,4 $\pm$ 6,7
<b>Número de oócitos viáveis</b>	26,0 $\pm$ 3,5	7,9 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,9	27,7 $\pm$ 3,5	10,2 $\pm$ 1,5	9,8 $\pm$ 1,4	27,8 $\pm$ 2,8	11,7 $\pm$ 2,0	8,9 $\pm$ 1,4
<b>Taxa de oócitos viáveis (%)</b>	73,4 $\pm$ 3,2	60,6 $\pm$ 4,2	61,5 $\pm$ 5,0	73,2 $\pm$ 2,8	62,0 $\pm$ 3,0	68,4 $\pm$ 3,8	73,3 $\pm$ 2,6	68,0 $\pm$ 2,5	58,2 $\pm$ 4,9
<b>Número de estruturas no CIV</b>	24,7 $\pm$ 3,5	7,1 $\pm$ 1,1	7,9 $\pm$ 0,9	25,9 $\pm$ 3,2	9,5 $\pm$ 1,5	9,6 $\pm$ 1,4	26,2 $\pm$ 2,7	10,6 $\pm$ 1,8	8,7 $\pm$ 1,3
<b>Taxa de oócitos no CIV (%)</b>	68,6 $\pm$ 4,1	53,8 $\pm$ 4,0	59,5 $\pm$ 5,1	68,6 $\pm$ 2,7	58,0 $\pm$ 3,6	66,3 $\pm$ 3,8	69,1 $\pm$ 2,6	61,2 $\pm$ 3,3	56,8 $\pm$ 4,8
<b>Número de estruturas clivadas</b>	20,6 $\pm$ 3,2	4,1 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 2,7	5,5 $\pm$ 1,1	5,9 $\pm$ 0,8	21,1 $\pm$ 2,3	5,9 $\pm$ 1,0	5,1 $\pm$ 0,9
<b>Taxa de clivagem (%)</b>	82,4 $\pm$ 3,6	62,5 $\pm$ 5,8	61,4 $\pm$ 5,4	85,1 $\pm$ 2,2	57,4 $\pm$ 7,0	68,1 $\pm$ 5,0	80,3 $\pm$ 2,5	59,7 $\pm$ 5,9	61,1 $\pm$ 5,0
<b>Número de blastocistos no D7</b>	7,2 $\pm$ 1,7	1,1 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3	7,7 $\pm$ 1,5	1,2 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2
<b>Taxa de blastocistos (%)</b>	28,1 $\pm$ 5,6	16,6 $\pm$ 5,2	14,5 $\pm$ 4,0	28,4 $\pm$ 4,7	15,7 $\pm$ 5,9	6,3 $\pm$ 2,3	28,4 $\pm$ 4,8	10,0 $\pm$ 3,7	10,0 $\pm$ 3,6
<b>Número de blastocistos eclodidos</b>	3,7 $\pm$ 1,1	0,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
<b>Taxa de eclosão (%)</b>	40,7 $\pm$ 9,1	28,9 $\pm$ 14,9	38,3 $\pm$ 14,5	52,9 $\pm$ 8,4	22,2 $\pm$ 8,8 $\pm$	28,6 $\pm$ 18,4	52,5 $\pm$ 8,3	23,3 $\pm$ 13,7	35,7 $\pm$ 18,0
<b>Número de núcleos dos embriões eclodidos</b>	173,0 $\pm$ 9,1	116,5 $\pm$ 23,0	225,1 $\pm$ 35,3	185,1 $\pm$ 9,0	199,5 $\pm$ 16,0	191,3 $\pm$ 38,6	168,9 $\pm$ 9,1	175,5 $\pm$ 17,2	183,5 $\pm$ 73,5

Os dados estão descritos como média  $\pm$  EPM

As variáveis descritas como contagens representam o número de estruturas/ doadora/ sessão, exceto número de núcleos dos embriões eclodidos

## 8.1 INTERAÇÃO ENTRE GRUPO GENÉTICO E RÉPLICA

As variáveis número de folículos visualizados, número de oócitos totais, número de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de estruturas no CIV, número de estruturas clivadas e taxa de clivagem apresentaram interação entre grupo genético e réplica como se pode observar na figura 5 (A a G).

(continua)

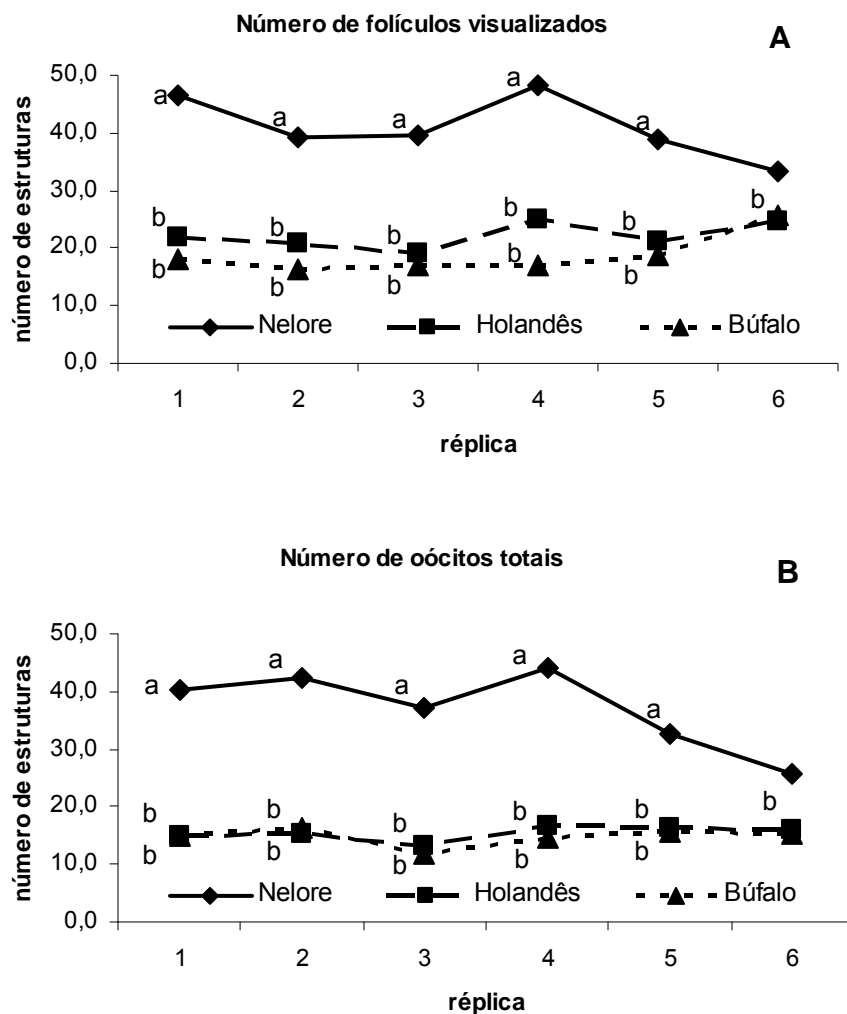


Figura 5 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos viáveis (C), taxa de oócitos viáveis (D), número de oócitos no cultivo in vitro (E), número de estruturas clivadas (F) e taxa de clivagem (G) – Pirassununga – SP – 2008

(continuação)

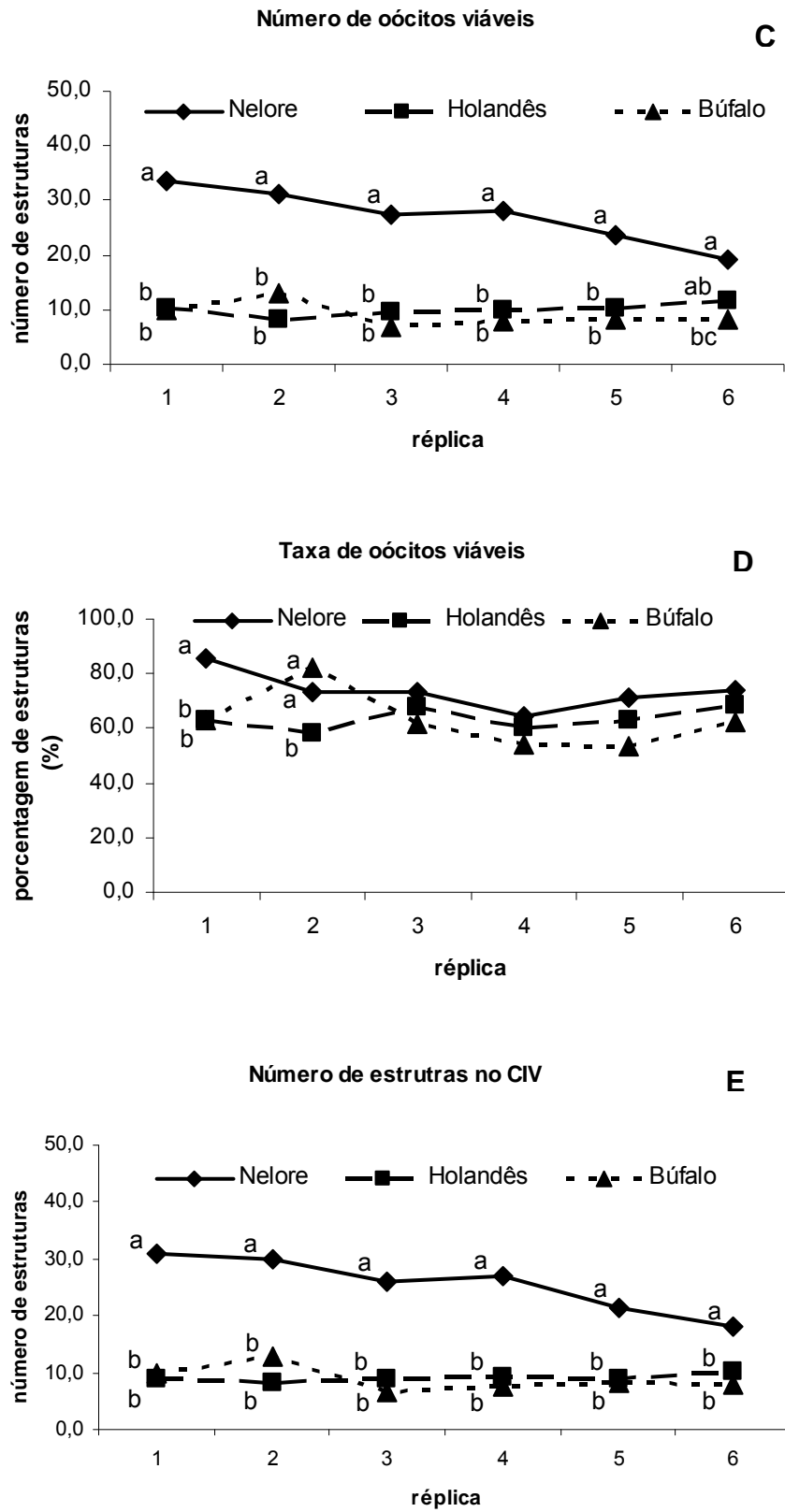


Figura 5 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de óocitos totais (B), número de óocitos viáveis (C), taxa de óocitos viáveis (D), número de óocitos no cultivo in vitro (E), número de estruturas clivadas (F) e taxa de clivagem (G) – Pirassununga – SP – 2008

(conclusão)

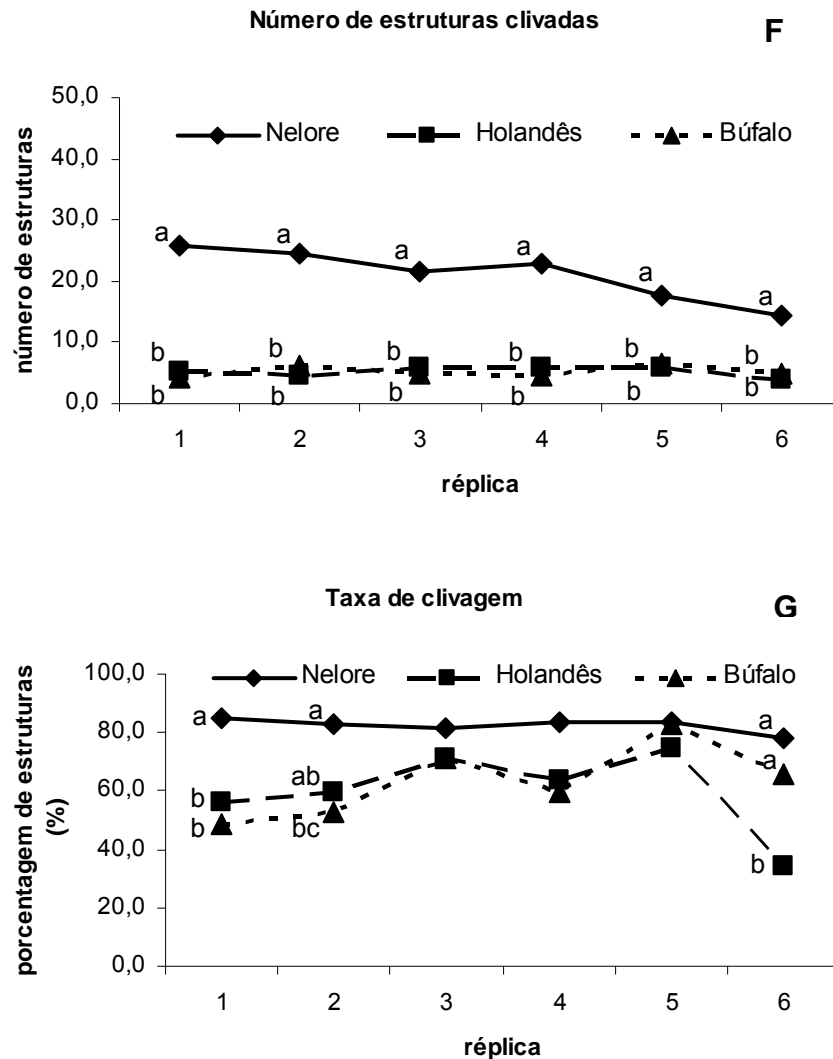


Figura 5 - Efeito de interação entre momento da OPU e réplica para número de folículos visualizados (A), número de oócitos totais (B), número de oócitos viáveis (C), taxa de oócitos viáveis (D), número de oócitos no cultivo in vitro (E), número de estruturas clivadas (F) e taxa de clivagem (G) – Pirassununga – SP – 2008

No presente experimento verificou-se que o número de folículos visualizados se manteve constante ao longo das sessões de aspiração folicular em novilhas Holandesas e bubalinas, permanecendo, entretanto, inferior ao observado em Nelore. Todavia, houve queda no número destas estruturas em novilhas Nelore na última réplica do estudo, igualando-se aos outros grupos genéticos (figura 5A). O mesmo padrão foi observado para o número de oócitos totais (figura 5B).

Em vacas da raça Holandesa, relata-se que o número de folículos visualizados (KRUIP et al., 1994; BONI et al., 1997) ou de oócitos recuperados

(KRUIP et al., 1994) não diminuem mesmo após sessões de aspiração folicular freqüentes (executadas em períodos de até 3 meses, duas vezes por semana), corroborando com os achados do presente estudo. Porém, Hasler (1998) demonstraram que pode ocorrer redução no número de oócitos a partir da 10ª sessão de OPU. Neste levantamento de dados, os autores acompanharam um único animal durante 167 sessões e verificaram decréscimo no número de oócitos recuperados. Isto pode ter ocorrido pontualmente, demonstrando um efeito individual no resultado apresentado por este autor.

Contudo, o mesmo não foi observado nas novilhas Nelore no presente estudo, sendo, porém, condizente com estudo realizado em vacas Gir submetidas ou não ao estresse calórico durante 17 sessões de OPU semanais (TORRES-JÚNIOR, 2007). Esta discrepância frente aos relatos em taurinos pode estar relacionada ao maior número de estruturas presentes nos ovários de bovinos de origem zebuína. Quanto maior é o número de folículos disponíveis para a OPU, maior é o risco de lesões ovarianas devido ao aumento no número de punções no órgão (VIANA et al., 2004). Ainda, enrijecimento do córtex ovariano e cicatrizes em partes da vagina foram identificados por outros autores (BONI et al., 1997; PETYIM et al., 2001) sem que houvesse, no entanto, comprometimento na fisiologia ovariana (KRUIP et al., 1994; BONI et al., 1997) ou na fertilidade após o término dos estudos (KRUIP et al., 1994). Adicionalmente, e de forma especulativa, é possível que em animais com maior quantidade de estruturas ovarianas, evidenciado no presente estudo nas novilhas Nelore, a aspiração folicular altere de forma mais severa a reconstituição do “pool” de folículos antrais entre 1 a 3 mm que será recrutado em uma próxima onda de crescimento folicular do que naqueles que apresentam menor reserva ovariana. Deste modo, maior tempo para a recuperação no número de estruturas pode ser requerido, gerando queda ao longo das sessões de OPU.

Em bubalinos, alguns autores afirmam não haver redução no número de folículos visualizados e no número de oócitos recuperados ao longo de dois meses de aspiração folicular, realizadas duas vezes por semana (BONI; ROVIELO; ZICARELLI, 1996), contrariamente a outros pesquisadores (SÁ FILHO et al., 2009), que verificaram diminuição no número de estruturas a partir da 6ª sessão de punção folicular, realizada também duas vezes por semana. Adicionalmente, verificou-se efeito de sessão de aspiração em outro estudo realizado na espécie (FERRAZ,

2008), no qual os efeitos de intervalo entre sessões de OPU (1 ou 2 vezes por semana) e do uso de bST (controle ou bST) foram testados.

Nas condições do presente estudo, a redução no número de folículos visualizados e oócitos totais ocorreu em novilhas Nelore mesmo com intervalos entre aspirações foliculares de 14 dias. Ambas as variáveis estão diretamente relacionadas e o decréscimo das mesmas ao final do presente estudo sugere que nesta raça bovina é necessário maior intervalo entre sessões de aspiração folicular quando punções repetidas são realizadas.

Quanto à qualidade oocitária, pode-se observar diferença nítida entre os grupos genéticos quanto ao número de oócitos viáveis, sendo as novilhas Nelore novamente superiores às Holandesas e bubalinas (figura 5C). Isto pode ser decorrente de diferenças nas concentrações de IGF-1 circulantes, e será discutido a seguir no tópico sobre efeitos principais de grupo genético. Entretanto, observou-se queda no número de oócitos viáveis nas novilhas bubalinas em comparação às Nelore na última sessão de aspiração folicular, permanecendo as Holandesas em nível intermediário. É possível que o declínio observado na qualidade oocitária nos bubalinos do presente estudo seja decorrente da última réplica ter sido realizada em outubro, quando o aumento no fotoperíodo já poderia ser percebido. Contudo, não corrobora com recente trabalho (MANJUNATHA et al., 2009) no qual o período reprodutivo (favorável ou desfavorável) não influenciou o número e tampouco a taxa de oócitos de boa qualidade (A + B) para a produção *in vitro*. Talvez esta discrepância possa ser atribuída à diferença no critério de avaliação de qualidade oocitária, uma vez que no presente estudo oócitos com pelo menos uma camada de células do *cumulus* (grau C, segundo MANJUNATHA et al., 2009) foram incluídas para os procedimentos *in vitro*, o que não ocorreu no experimento destes outros estudiosos.

O número de estruturas que entraram para o cultivo *in vitro*, bem como o número de estruturas clivadas, refletiu os achados anteriores embora as interações para estas variáveis não sejam evidenciadas graficamente dentro do período empregado no presente estudo.

As interações ocorridas para taxa de oócitos viáveis e taxa de clivados são de difícil interpretação, pois não apresentam a mesma consistência que as variáveis anteriores.

## 8.2 EFEITO DE MOMENTO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Os resultados para efeito principal de momento da OPU em relação à emergência da onda de crescimento folicular estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Efeito do momento da OPU em relação à emergência da onda de crescimento folicular (D1, D3 e D5) sobre a aspiração folicular e produção de embriões *in vitro* – Pirassununga – SP – 2008

	D1 (n=9)	D3 (n=9)	D5 (n=9)	Valor de P
<b>Número de réplicas</b>	6	6	6	-
<b>Número de folículos visualizados</b>	26,6 ± 1,8	27,8 ± 2,2	27,4 ± 2,0	0,82
<b>Número de oócitos totais</b>	21,2 ± 2,2	22,5 ± 2,2	23,5 ± 2,3	0,56
<b>Taxa de recuperação (%)</b>	70,5 ± 3,1	75,0 ± 3,1	76,0 ± 3,2	0,41
<b>Número de oócitos viáveis</b>	14,1 ± 1,7	15,9 ± 1,8	16,2 ± 1,7	0,12
<b>Taxa de oócitos viáveis (%)</b>	65,1 ± 2,5	67,8 ± 1,9	66,5 ± 2,2	0,67
<b>Número de oócitos no CIV</b>	13,2 ± 1,7	15,0 ± 1,6	15,2 ± 1,6	0,06
<b>Taxa de oócitos no CIV (%)</b>	60,6 ± 2,6	64,3 ± 2,0	62,4 ± 2,2	0,48
<b>Número de estruturas clivadas</b>	9,7 ± 1,5	11,0 ± 1,4	10,7 ± 1,3	0,15
<b>Taxa de clivagem (%)</b>	68,8 ± 3,1	70,2 ± 3,3	67,0 ± 3,0	0,62
<b>Número de blastocistos no D7</b>	2,9 ± 0,7	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,6	0,76
<b>Taxa de blastocistos (%)</b>	19,4 ± 2,9	16,6 ± 2,9	15,9 ± 2,6	0,36
<b>Número de blastocistos eclodidos</b>	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,56
<b>Taxa de eclosão (%)</b>	36,8 ± 6,9	38,9 ± 6,6	41,2 ± 7,0	0,68
<b>Número de núcleos dos embriões eclodidos</b>	176,4 ± 10,0	187,6 ± 8,2	170,6 ± 8,3	0,35

Os dados estão descritos como média ± EPM

As variáveis descritas como contagens representam o número de estruturas/ doadora/ sessão, exceto número de núcleos dos embriões eclodidos

Não se observou efeito de momento de OPU para o número de folículos visualizados, número de oócitos totais e taxa de recuperação.

Tal ausência de efeito de sincronização da onda na eficiência da OPU-PIV também foi observada por Melo (2007) em vacas Nelore. Este autor obteve em



média 17,4 folículos visualizados, 13,2 oócitos totais, com média de recuperação de 75,4%, quando a OPU foi realizada 3, 5, 7 ou 9 dias após a emergência folicular. Também no Capítulo 1 da presente Tese, não foram detectadas diferenças entre os momentos da OPU em relação à emergência da onda de crescimento folicular para as mesmas variáveis. Contudo, Ramos et al. (2010) verificaram menor número de folículos visualizados em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) aspiradas com aproximadamente 3 dias após a emergência do que naquelas aspiradas 6 dias após (14,1 vs. 17,5, respectivamente;  $P < 0,05$ ), embora não tenham verificado diferenças no número de oócitos recuperados. Adicionalmente, Machatková et al. (2000) constataram maior número de oócitos totais em vacas Holandesas aspiradas na fase de crescimento (dias 1 a 3 do ciclo estral; 6,2 estruturas) quando comparadas àquelas na fase de dominância final (dias 15 e 16; 2,8 estruturas). Possivelmente a recuperação de oócitos não variou entre os grupos em estudo devido à aspiração de oócitos provenientes de folículos que não fazem parte da onda de crescimento folicular sincronizada, ou por ainda não fazerem parte do próximo “pool” a ser recrutado ou, contrariamente, por já terem iniciado o processo de atresia.

Também não houve diferença entre os grupos quanto à qualidade oocitária (Tabela 3), corroborando com outros estudos nos quais foram obtidos, em média, entre 3,4 e 14,1 oócitos viáveis/ doadora/ OPU (MACHATKOVÁ et al., 2000; VASSENA et al., 2003; MELO, 2007; RAMOS et al., 2010).

Não foram identificadas diferenças entre os momentos de OPU para número de embriões clivados ou taxa de clivagem, em concordância com outros autores (MELO, 2007; RAMOS et al., 2010). Porém, Vassena et al. (2003) obtiveram maior taxa de embriões clivados a 8-16 células nos grupos aspirados 2 (52,2<sup>a</sup>) ou 5 dias após a emergência folicular (44,4%<sup>ab</sup>) em comparação aos grupos aspirados 3 (37,0<sup>b</sup>) ou 7 dias após (34,9%<sup>b</sup>;  $P < 0,05$ ).

Tampouco houve efeito de momento da OPU para número ou taxa de blastocistos 7 dias após a FIV, fato também reportado por Ramos et al. (2010). De maneira semelhante ao ocorrido no presente estudo, Witt, Wurt e Kruip (2000) não observaram influência da fase do ciclo estral (fases luteínica precoce, tardia, folicular e anestro), quando compararam o desenvolvimento de oócitos de graus A e B. A ausência do efeito de momento de sincronização para OPU não era esperada, visto que alguns autores apontam que a competência de oócitos *in vitro* está relacionada

ao estágio do ciclo estral em que este oócito foi colhido (MACHATKOVÁ et al., 1996, 2000, 2004; VASSENA et al., 2003), embora não haja um consenso sobre o melhor momento para a realização da OPU. Segundo Hendriksen et al. (2000), oócitos colhidos de folículos em estágio inicial de atresia, ou seja, em fase estática ou de regressão inicial, apresentam melhor competência para o desenvolvimento embrionário, a despeito de uma possível alteração morfológica. Estes autores verificaram que houve prejuízo na produção embrionária somente na fase de dominância tardia (D8: 15%), quando comparado aos outros momentos (D2: 27%; D5: 29%). Em concordância com estes dados, Melo (2007) também obteve maior número e taxa de blastocistos quando as fêmeas foram aspiradas 3 ou 5 dias após a emergência folicular, em comparação àquelas aspiradas nos dias 7 ou 9. Segundo o autor, é possível que o resultado inferior obtido nos grupos aspirados mais tardiamente (7 e 9 dias após a emergência folicular), tenha sido decorrente de mais avançado grau de atresia folicular, o que poderia ter comprometido a competência oocitária. Apesar de haver indícios de que a fase da onda de crescimento folicular é importante na produção embrionária, pode-se dizer que, conjuntamente, os trabalhos de Melo (2007), Ramos et al. (2010), ou ainda de Hendriksen et al. (2000) corroboram com os achados obtidos no presente estudo. É possível que os momentos adotados para OPU no presente estudo não tenham sido suficientemente tardios para demonstrar um efeito relacionado à fase folicular na OPU-PIV, pois provavelmente não houve estágio avançado de atresia em nenhum dos grupos experimentais. Talvez a inclusão de um grupo mais avançado (7 ou 8 dias após a emergência folicular) pudesse elucidar essa questão. Contudo, um problema de origem prática poderia surgir no experimento. Em animais com duas ondas de crescimento folicular, o período de 7 ou 8 dias após a emergência representaria a fase estática de dominância, porém em animais com três ondas, representaria a fase de atresia do folículo dominante, devido ao maior turnover folicular. Com o início do declínio do folículo dominante, uma nova onda seria recrutada e oócitos provenientes de folículos em fase de crescimento seriam recuperados juntamente com aqueles que estariam em atresia, podendo confundir a análise dos resultados.

Outra medida de qualidade embrionária é o número de embriões eclodidos e a taxa de eclosão, bem como o número de núcleos dos embriões eclodidos, que também não diferiram entre os tratamentos no presente estudo. Estes resultados não confirmam os previamente encontrados no experimento do Capítulo 1 e,

provavelmente, são resultantes do baixo número de embriões produzidos. Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham avaliado as taxas de eclosão e a contagem de núcleos em diferentes fases da onda de crescimento folicular, visto que o desenvolvimento embrionário foi acompanhado somente até a fase de blastocisto.

O efeito de momento da OPU encontrado no estudo piloto não foi evidenciado no estudo objeto da presente Tese. Contudo, das variáveis significativas no primeiro experimento, somente o número de embriões eclodidos e a contagem de núcleos poderiam ser levados em consideração, uma vez que no presente estudo não foi avaliada a taxa de blastocistos 6 dias pós-FIV. A ausência de efeito da fase da onda de crescimento folicular talvez possa ser atribuída às baixas taxas de blastocistos produzidos na presente Tese, o que pode ter prejudicado um possível efeito, devido ao reduzido número de unidades experimentais.

A partir dos resultados do presente estudo, no qual não houve diferença entre os diferentes momentos de OPU em relação à emergência da onda de crescimento folicular, torna-se questionável se a sincronização é necessária em comparação à OPU realizada em dia aleatório do ciclo estral. Para esclarecer esta questão, um recente trabalho foi realizado em vacas da raça Nelore e Brangus, empregando a mesma metodologia, porém não contemporaneamente (REIS et al., 2010). Os animais foram divididos em um grupo controle (aspiração em dia aleatório do ciclo estral), e outros três nos quais a aspiração foi realizada um dia após a emergência folicular sincronizada, sendo D1, D1+eCG (eCG administrado no início do protocolo de sincronização) e D1+bST (bST administrado no início do protocolo de sincronização). Os autores observaram que em Nelore não houve diferença entre os grupos para número de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de blastocistos e taxa de blastocistos. Entretanto, no grupo D1 + bST menor número de oócitos totais foram recuperados em relação aos outros tratamentos. Já em Brangus, a OPU do grupo D1 + eCG promoveu aumento tanto no número de oócitos totais, quanto nos viáveis. Este tratamento não resultou em maior taxa de blastocistos produzidos, o que ocorreu somente no grupo D1. De forma global, talvez seja possível inferir que a sincronização da onda de crescimento folicular é importante na OPU-PIV em relação à aspiração folicular realizada em dia aleatório do ciclo estral e, que raças diferentes podem ser beneficiadas em maior ou menor extensão por este tratamento.

### 8.3 EFEITO DE GRUPO GENÉTICO

Os resultados para efeito principal de grupo genético estão representados na tabela 6.

Tabela 6 - Efeito do grupo genético (Nelore - NEL, Holandesa - HOL e Búfala - BUF) sobre a aspiração folicular e produção de embriões *in vitro* – Pirassununga – SP – 2008

	NEL (n=9)	HOL (n=9)	BUF (n=9)	Valor de P
<b>Número de réplicas</b>	6	6	6	-
<b>Número de folículos visualizados</b>	41,0 <sup>a</sup> ± 2,1	22,1 <sup>b</sup> ± 1,3	18,8 <sup>b</sup> ± 0,9	< 0,01
<b>Número de oócitos totais</b>	37,1 <sup>a</sup> ± 2,6	15,4 <sup>b</sup> ± 1,2	14,8 <sup>b</sup> ± 1,0	<0,01
<b>Taxa de recuperação (%)</b>	82,3 ± 2,5	66,8 ± 2,8	72,5 ± 3,6	0,07
<b>Número de oócitos viáveis</b>	27,2 <sup>a</sup> ± 1,9	9,9 <sup>b</sup> ± 0,9	9,0 <sup>b</sup> ± 0,7	< 0,01
<b>Taxa de oócitos viáveis (%)</b>	73,3 <sup>a</sup> ± 1,6	63,5 <sup>b</sup> ± 1,9	62,7 <sup>b</sup> ± 2,7	0,01
<b>Número de oócitos no CIV</b>	25,6 <sup>a</sup> ± 1,8	9,1 <sup>b</sup> ± 0,9	8,8 <sup>b</sup> ± 0,7	<0,01
<b>Taxa de oócitos no CIV (%)</b>	68,8 <sup>a</sup> ± 1,8	57,7 <sup>b</sup> ± 2,1	60,9 <sup>ab</sup> ± 2,7	0,01
<b>Número de estruturas clivadas</b>	21,1 <sup>a</sup> ± 1,6	5,2 <sup>b</sup> ± 0,5	5,2 <sup>b</sup> ± 0,4	<0,01
<b>Taxa de clivagem (%)</b>	82,6 <sup>a</sup> ± 1,6	59,9 <sup>b</sup> ± 3,6	63,5 <sup>b</sup> ± 2,9	0,02
<b>Número de blastocistos no D7</b>	7,3 <sup>a</sup> ± 0,9	1,1 <sup>b</sup> ± 0,2	0,7 <sup>b</sup> ± 0,1	<0,01
<b>Taxa de blastocistos (%)</b>	28,3 <sup>a</sup> ± 2,8	14,1 <sup>b</sup> ± 2,9	10,2 <sup>b</sup> ± 2,0	<0,01
<b>Número de blastocistos eclodidos</b>	3,7 <sup>a</sup> ± 0,5	0,4 <sup>b</sup> ± 0,1	0,3 <sup>b</sup> ± 0,1	<0,01
<b>Taxa de eclosão (%)</b>	49,0 ± 4,9	24,9 ± 7,1	34,7 ± 9,2	0,13
<b>Número de núcleos dos embriões eclodidos</b>	176,6 ± 5,3	168,9 ± 13,7	206,1 ± 23,1	0,35

Os dados estão descritos como média ± EPM

As variáveis descritas como contagens representam o número de estruturas/ doadora/ sessão, exceto número de núcleos dos embriões eclodidos

Verificou-se que o número de folículos visualizados e oócitos totais foi maior em novilhas Nelore do que em novilhas Holandesas ou bubalinas. O número de folículos visualizados está diretamente relacionado ao número de estruturas presentes no momento da emergência folicular, sendo este critério uma boa

ferramenta para a seleção de doadoras em programas de OPU/ SOV, devido à alta repetibilidade ( $r = 0,576$ ) desta característica em um mesmo indivíduo (BONI et al., 1997; BURNS et al., 2005). Embora o presente estudo não tenha sido delineado para identificar o efeito de doadora, é possível verificar que parte das causas de variação do mesmo pode ser atribuída a este efeito, e que isto foi levado em consideração no planejamento do desenho experimental. No Experimento 1 do presente Capítulo, observou-se que novilhas Nelore recrutaram mais estruturas no momento da emergência folicular do que novilhas Holandesas e bubalinas (29,7 folículos vs. 15,0 e 13,1, respectivamente). Este padrão foi mantido também no experimento 2 do presente Capítulo, uma vez que os mesmos animais foram utilizados em ambos, indicando a repetibilidade do número de folículos, de modo condizente com os resultados de Boni et al. (1997) e Burns et al. (2005).

Ainda que outros trabalhos não sejam contemporâneos, é possível perceber que o número médio de estruturas no momento do recrutamento é maior em Nelore do que nos outros grupos genéticos, nos quais são observados em média 23,9 folículos em Holandesas (GINTHER et al., 1997) e entre 5,1 e 7,7 em bubalinos (BARUSELLI et al., 1997). Em bubalinos, o baixo número de folículos antrais foi previamente relatado (TY et al., 1989) e, possivelmente, está relacionado ao menor número de folículos primordiais característico desta espécie (DANELL, 1987), refletindo menor número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular e menor número de oócitos totais recuperados. Partindo desta hipótese, é provável que as diferenças nas contagens de folículos antrais entre as raças de bovinos, como Nelore e Holandês, também possam ser atribuídas a diferenças na reserva ovariana. Outro possível mecanismo para tal evidência estaria relacionado ao sistema IGF. Existem indícios de que o sistema IGF difere entre zebuínos e taurinos. Estudos realizados com vacas Brahman foram sugestivos de que esses animais apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-I (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000) e menores concentrações de FSH quando comparadas com vacas Angus (ALVAREZ et al., 2000). Por este motivo, alguns autores levantaram a hipótese de que o maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003).

O número de oócitos totais obtidos no presente estudo foi superior aos encontrados em outros trabalhos da literatura para todos os grupos genéticos

(NELORE: entre 11,1 a 25,6 oócitos; MELO, 2007; PONTES et al., 2009; HOLANDÊS: entre 2,8 a 6,0; RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; LOPES et al., 2006 e BUBALINOS: entre 0,7 a 10,0; PROMDIREG et al., 2005; FERRAZ et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2009), em relação direta ao número de folículos visualizados. De maneira semelhante, as taxas de recuperação também se mostraram superiores quando confrontadas com outros trabalhos, possivelmente em função do alto número de folículos e oócitos recuperados. Outros fatores como nutrição, período do ano, além daqueles relacionados às diferenças técnicas podem ter contribuído para estes resultados.

Com relação ao número de oócitos viáveis, houve novamente superioridade do Nelore em comparação ao Holandês e aos bubalinos. Adicionalmente, a taxa de viáveis neste último grupo genético foi menor em relação aos outros. Em bubalinos este fato é esperado e pode ser atribuído ao alto índice de atresia folicular desta espécie em relação à espécie bovina (revisado em MANIK et al., 2002) e às frágeis ligações entre o oócito e o folículo ovariano (GASPARRINI, 2002; MONDADORI et al., 2007, 2010). Em bovinos da raça Holandesa, a qualidade oocitária foi relacionada ao status lactacional e ao nível energético da dieta (GWAZDAUSKAS et al., 2000). Contudo, os animais do presente estudo foram submetidos ao mesmo tipo de nutrição e ainda não apresentavam efeito de lactação, visto que eram novilhas. Novamente é possível que o sistema IGF possa contribuir para diferenças entre os grupos genéticos não somente quanto à quantidade, mas também quanto à qualidade oocitária. O sistema IGF está associado à síntese de estradiol em folículos antrais, em ação sinérgica ao FSH e induzida por este hormônio, via aumento de proteases (IGFBP-4 protease e IGFBP-5 protease) que disponibilizam o IGF-1 na forma livre no interior do folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Além disso, componentes do sistema IGF são expressos no oócito (NUTTINCK et al., 2004) e participam, ao menos *in vitro*, acelerando o processo de maturação nuclear (SAKAGUCHI et al., 2002) e apresentando *in vivo* impacto sobre a competência oocitária e sobre os embriões oriundos de animais superovulados (VELASQUEZ et al., 2009). Deste modo, as maiores concentrações de IGF-1 descritas em zebuínos podem contribuir para a melhor qualidade oocitária observada neste grupo genético em relação aos taurinos e, possivelmente, em relação aos bubalinos. Outra possibilidade para a pior qualidade dos oócitos de Holandesas e de búfalas em relação aos de Nelore, a título de especulação, talvez possa estar relacionada a

diferenças quanto ao estresse oxidativo, podendo estar ligado à redução na produção de algum tipo de antioxidante como a glutatona, que sabidamente é crítica para a maturação citoplasmática (EPIGG, 1996) e que, conseqüentemente, é importante para que a fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorram normalmente.

A taxa de clivagem também foi maior nas novilhas Nelore do que nas Holandesas e bubalinas. Baixas taxas de clivagem foram previamente descritas em outros estudos conduzidos em bubalinos (26,0 e 65,0%; GASPARRINI, 2002; FERRAZ et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2009; SALIBA et al., 2009), e estão relacionadas à qualidade do oócito e capacidade de sofrer adequadas maturações nuclear e citoplasmática, além da qualidade do sêmen congelado utilizado na FIV (GASPARRINI, 2002). Segundo esta autora, pouca diferença é detectada na maturação de oócitos bubalinos e bovinos (87% vs. 94%), contudo menores taxas de clivagem indicam um papel crítico na fecundação, pois pequena porcentagem dos touros apresenta boa capacidade nos procedimentos *in vitro*, devido ao próprio processamento do sêmen para a PIV (KRUIP et al., 1994). Este mesmo raciocínio pode ser extrapolado para explicar as diferenças encontradas no presente estudo para as duas raças bovinas. Em Nelore, a taxa de clivagem obtida está dentro da faixa encontrada por outros autores (entre 63,5 a 87,4%; MELO, 2007; EBERHARDT et al., 2009), porém a taxa obtida na raça Holandesa foi inferior à expectativa, uma vez que foram reportadas taxas entre 65 e 75% (SENEDA et al., 2001; PAULA-LOPES et al., 2003; ESCALONA et al., 2008), podendo sugerir efeito de sêmen sobre as taxas obtidas. Contudo, taxas de clivagem inferiores às previamente relatadas, e mais similares às do presente estudo foram descritas na literatura para Holandesas (entre 37,9 e 61,3%; BILBY et al., 2006; FERREIRA et al., 2010). Outros trabalhos dão indícios de que o oócito também contribui para os resultados da produção *in vitro*. Bilby et al. (2006), avaliou o efeito de raça sobre a clivagem de oócitos de ovários provenientes de matadouro de Holandesas ou não Holandesas, e verificou que embora a raça não tenha exercido efeito sobre a proporção de oócitos clivados (68,0 vs. 78,9%, respectivamente), houve tendência de maior proporção de embriões clivados a 8 células para as fêmeas não Holandesas. Sendo assim, parece haver diferenças entre raças quanto à qualidade oocitária, que refletem nas taxas de desenvolvimento subsequente.

Embora taxas de blastocistos 7 dias após a FIV semelhantes às obtidas no presente estudo tenham sido encontradas na literatura (NELORE: 24,9%; EBERHARDT et al., 2009; HOLANDÊS: 12,4% e 12,7%; RIZOS et al., 2005; EBERHARDT et al., 2009 e BUBALINOS: 10,9%; FERRAZ et al., 2007), pode-se considerar que estas foram abaixo do esperado (entre 30 a 40% para bovinos, HASLER et al., 1995; e entre 15 a 30% para bubalinos, NANDI et al., 2002). Dentre as diversas causas, é possível que o comprometimento nos resultados obtidos seja decorrente do tipo de sistema de cultivo empregado. No presente estudo, o sistema empregado foi o de co-cultivo, devido ao menor custo e à maior facilidade para a manipulação no laboratório em relação ao sistema com mistura de gases. Contudo, há indícios de que o co-cultivo com outros tipos celulares como, por exemplo, células da granulosa ou de oviduto, promove redução nas taxas de blastocisto (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; RIZOS et al., 2001) e também atraso na cinética de desenvolvimento quando comparado a sistemas semi-definidos (SOF com ou sem suplementação de soro fetal bovino; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001).

De qualquer maneira, diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* na produção de embriões *in vitro* foram recentemente relatados (ESCALONA et al., 2008), dando suporte aos achados do presente estudo. Ao comparar oócitos de Holandesas e de Brahman (fertilizados com sêmen de Holandês) os autores verificaram melhor eficiência dos *Bos indicus* quanto à maturação nuclear (60,3 vs. 34,7%), taxa de clivagem (92,4 vs. 69,4%) e taxa de blastocistos (29,5 vs. 17,5%), e atribuiu tais diferenças à maior resistência da raça Brahman ao estresse térmico. Semelhantemente, Paula-Lopez et al. (2003) observaram que embriões Brahman submetidos ao estresse térmico apresentaram efeitos menos pronunciados na formação de blastocistos e no número de núcleos do que embriões da raça Holandesa ou Angus. Em outro recente estudo (EBERHARDT et al., 2009) é enfatizada a maior termotolerância dos embriões de Nelore frente aos de Holandês, tendo sido demonstrado que a contribuição para tal resistência é oriunda tanto dos oócitos, quanto do sêmen. Esta afirmação ainda é controversa, visto que em recente publicação (NABHAN et al., 2010) do mesmo grupo de pesquisa, concluiu-se que o oócito é mais importante do que os espermatozóides para o desenvolvimento de termotolerância, considerando-se que a raça dos touros utilizados no experimento não influenciou o desenvolvimento embrionário após exposição ao estresse térmico. Para finalizar, e apoiando as diferenças entre raças de bovinos, em recente trabalho



(REIS et al., 2010) comentado previamente neste Capítulo, verificaram-se respostas diferentes à aspiração realizada de forma sincronizada ou em dia aleatório do ciclo estral entre vacas Nelore e Brangus, embora o objetivo do estudo não tenha sido comparar o efeito de raça.

Quanto aos bubalinos, a menor eficiência da espécie para a PIV foi reportada por Neglia et al. (2003) ao comparar oócitos provenientes de ovários de matadouro de origem bovina e bubalina. Neste estudo, maiores taxas de clivagem e blastocisto foram registradas nos bovinos (83,9 e 29,7%, respectivamente) em relação aos bubalinos (64,8 e 19,9%, respectivamente), e os autores acreditam que uma das causas possa ser uma maior sensibilidade dos oócitos bubalinos ao estresse ambiental. Contudo, tal afirmação parece contraditória uma vez que os bubalinos são animais de clima tropical e apresentam altos índices de concepção em condições a campo, contrariamente aos bovinos da raça Holandesa originários de clima temperado.

Um modo de avaliar a qualidade dos embriões PIV pode ser feito observando o estágio de desenvolvimento em relação ao tempo (PALTA; CHAHUAN, 1998). Contudo outras medidas como taxa de eclosão e contagem de núcleos podem ser também utilizadas por serem bons indicadores (PALTA; CHAHUAN, 1998; GASPARRINI, 2002; ANAND et al., 2008). Em bubalinos, maior precocidade no desenvolvimento embrionário é relatada, tanto para embriões oriundos de SOV, quanto para os obtidos por PIV, sendo observada a eclosão entre 5 e 7 dias do ciclo estral (GASPARRINI, 2002). Esta pesquisadora acredita que a viabilidade de embriões lentos é pequena, e que deficiências nos sistemas de cultivo levem a baixas taxas de eclosão na espécie. No presente estudo a taxa de eclosão obtida em bubalinos foi inferior à encontrada em recente trabalho (entre 68,7 e 85,0%; ANAND et al., 2008), embora a contagem de núcleos tenha sido superior à média de 153,7 células descrita por este mesmo autor. Esta diferença quanto ao número de núcleos deve-se ao fato de no presente estudo terem sido utilizados somente embriões eclodidos, ao passo que no relato de Anand et al. (2008) foram empregados também blastocistos para esta finalidade. Em Holandesas há poucos trabalhos nos quais foram avaliadas as taxas de eclosão ou número de núcleos. Bilby et al. (2006) encontraram porcentagens de blastocistos eclodindo e eclodidos 8 dias após a FIV variando de aproximadamente 3 a 12%, muito inferiores às do presente estudo, provavelmente devido à precocidade na avaliação realizada por

este autor. Entretanto, taxas de eclosão 8 dias após a FIV semelhantes às do presente estudo foram descritas recentemente (FERREIRA et al., 2010) para diferentes categorias de Holandesas (novilhas, vacas em pico de lactação e repeat-breeders) avaliadas no verão e no inverno. Para esta variável, não houve efeito de categoria animal, porém observou-se maior taxa de eclosão no inverno em relação ao verão (23,0% vs. 6,5%). Quanto ao número de núcleos, resultados bastante divergentes foram encontrados, relacionados possivelmente a diferenças na qualidade dos oócitos para a produção *in vitro* ou do tipo de sistema utilizado em comparação ao presente estudo. Fouladi-Nashta et al. (2007) realizaram contagem diferencial em embriões com 8 dias de cultivo e obtiveram entre 132,5 e 150,5 núcleos totais, sendo entre 98,6 e 114,0 células do trofotoderma e 33,8 e 36,4 células da massa celular interna. Por outro lado, Ferreira et al. (2010) observaram maior número de núcleos em embriões produzidos no inverno do que no verão ( $231 \pm 7$  vs.  $253 \pm 12$ ), havendo também diferenças entre categorias, sendo maiores as contagens de células em novilhas ( $253 \pm 12$ ) do que em vacas em pico de lactação ( $203 \pm 10$ ) e repeat-breeders ( $207 \pm 8$ ;  $p < 0,01$ ). Em Nelore, Eberhardt et al. (2009) encontraram taxas de eclosão entre 9 a 14%, porém não foram encontrados trabalhos com contagem de núcleos nesta raça bovina.

## 9 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

Não houve diferença quanto à recuperação, qualidade e competência oocitária para produção de embriões *in vitro* quando a aspiração folicular foi realizada 1, 3 ou 5 dias após a emergência folicular, não confirmando a primeira hipótese do presente estudo.

Verificou-se melhor recuperação, qualidade e competência oocitária em novilhas Nelore, em comparação às novilhas Holandesas e bubalinas, confirmando parcialmente a segunda hipótese do presente estudo.

## 10 IMPLICAÇÕES

Como não se detectaram diferenças entre os momentos de realização da OPU, sugere-se que esta seja realizada um dia após a emergência folicular, uma vez que a permanência do implante de progesterona pode ser reduzida, possibilitando o aumento na frequência de OPU.

A queda no número de folículos visualizados e de oócitos totais nas novilhas Nelore ao final do presente estudo, sugere que maior intervalo entre aspirações seja adotado para este grupo genético, uma vez que o maior número de estruturas ovarianas pode favorecer maior risco de lesões.

A superioridade de novilhas Nelore frente a novilhas Holandesas ou bubalinas nos resultados de OPU-PIV confirma os achados comerciais, e explica em parte o sucesso da PIV no Brasil.

## 11 CONTRIBUIÇÃO PARA PESQUISAS FUTURAS

O presente estudo abre possibilidades de pesquisa relacionadas a:

- teste a campo com a finalidade de comparar a OPU realizada de acordo com sincronização prévia em diversos dias da onda de crescimento folicular ou em momento aleatório do ciclo estral;
- análise da expressão gênica de oócitos e embriões de doadoras pertencentes a diferentes grupos genéticos;
- adequação dos intervalos entre aspirações foliculares para novilhas da raça Nelore.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72–80, 2008.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 171–179, 2010.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 390–396, 2002.
- ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 214–218, 2003.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1291–1302, 2000.
- ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 253–257, 2008.
- ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reproductive biotechnologies. In: \_\_\_\_\_. **Reproduction in Cattle**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p.191-215.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; FERRAZ, M. L.; BARNABE, R. C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 285-292, 2007.
- BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, p. 1531-1547, 1997.
- BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3891–3903, 2006.

- BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1–12, 2010.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061-1075, 1997.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.
- BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VAN HOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906–914, 2004.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M. W.; PIETERSE, M.; KOGUT, J.; KRUIP, T. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 277-289, 1997.
- BONI, R.; ROVIELLO, S.; ZICARELLI, L. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**, v. 46, p. 899-909, 1996.
- BRENNER, R. H. **Punção folicular guiada por ultra-som em bovinos para a produção in vitro de embriões**. 1999. 46 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.
- BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 54–62, 2005.
- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VALE FILHO, V. R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 53–59, 2005.
- CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; GIMENES, L. U.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 1–11, 2010.
- CARVALHO, F. C. A.; OBA, E.; MOTA, A. V.; LEAL, L. S. Structural and ultrastructural characterization of buffalo fetus (*Bubalus bubalis*) ovarian germinative cells. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 688-690, 2007. Supplement, 2.
- CARVALHO, J. B.; CARVALHO, N. A.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols

in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

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

DANELL, B. **Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. 1987. 124 f. Thesis (PhD) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1987.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R. L.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 54-61, 2009.

EPIGG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 485-489, 1996.

ESCALONA, F.; MERCADO, J.; RODRIGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C.; KOWALSKY, A. A. Different response of *Bos indicus* vs. *Bos taurus* oocyte on maturation, cleavage and embryo development under in vitro system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 3, p. 188, 2008.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

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

FERRAZ, M. L. **Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção in vitro de embriões bubalinos**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FERRAZ, M. L.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; WATANABE, Y. F.; JOAQUIM, D. C.; ACCORSI, M. F.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. Effect of OPU interval and bST treatment on embryo production in buffalo. **Italian Journal Of Animal Science**, v. 6, p. 766-768, 2007.

FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; JOAQUIM, D. C.; WATANABE, M. R.; ACCORSI, M. F.; MEIRELLES, F. V.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Produção



*in vitro* de embriões bubalinos – resultados preliminares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 397, 2005. Supplement, 1.

FERREIRA, R. M. ; AYRES, H.; MAIO, J.R.G. ; BARUSELLI, P. S. Day of follicular wave emergence of Holstein heifers and cows submitted to protocols for synchronization of follicular wave emergence using or not injectable progesterone. **Animal Reproduction**, v. 6, p. 259, 2009.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; ARAUJO, A. B.; CHIARATTI, M. R.; SA FILHO, M. F.; CALOMENI, G.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; BARUSELLI, P. S. Ovum pick up and in vitro embryo production during the summer: differences between holstein heifers, high producing holstein cows in peak lactation and repeat-breeder holstein cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 290, 2010.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

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

FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 9-17, 2007.

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

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

GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. **Theriogenology**, v.57, p.237-256, 2002.

GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, p. 275–287, 2006.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v. 54, p. 1537-1542, 2000.

GHANEM, N.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; TORNER, H.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Alterations in

transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 90, 2007.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; VANNUCCI, F. S.; BIANCONI, L. L.; BISINOTTO, R. S.; REICHERT, R. H.; BELTRAN, M. P.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Follicle selection by ultrasonography and plasmatic characteristics and ovulatory capacity in buffaloes. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 629-631, 2007.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008.

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

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

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

GUPTA, V.; MANIK, R. S.; CHAUAN, M. S.; SINGLA, S. K.; AKSHEY, Y. S.; PALTA, P. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): oocyte recovery and quality. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 89-96, 2006.

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

GWAZDAUSKAS, F. C.; KENDRICK, K. W.; PRYOR, A. W.; BAILEY, T. L. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1625-1634, 2000.

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

HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 52-74, 1998.

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

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

HURK, R. van den; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751, 2005.

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

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1219–1225, 2008.

IRELAND, J. J.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 954–964, 2009.

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

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

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.

LIN, P. C.; BHATNAGAR, K. P.; NETTLETON, G. S.; NAKAJIMA, S. T. Female genital anomalies affecting reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 899-915, 2002.

LONERGAN, P.; SHARIF, H.; MONAGHAN, P.; WAHID, H.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield

following maturation, fertilization and culture in vitro. **Theriogenology**, v. 37, p. 248, 1992.

LOPES, A. S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 196–203, 2006.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; de LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 301-307, 1987.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; HORKY, F.; KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, p. 543–550, 2000.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; PETELIKOVA, J.; DVORACEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801–810, 1996.

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

MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v. 41, p. 246, 1994.

MANIK, R. S.; PALTA, P.; SINGLA, S. K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 315-325, 2002.

MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 155–161, 2003.

MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S.; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 12-16, 2009.

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

MANJUNATHA, B. M.; RAVINDRA, J. P.; GUPTA, P. S.; DEVARAJ, M.; NANDI, S. Oocyte recovery by ovum pick up and embryo production in river buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 477-480, 2008.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular em novilhas e vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona novo ou reutilizado associado ou não à progesterona injetável. **Acta scientiae veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 227, 2005.

MATOS, D. G. de; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1420-1425, 1997.

MATOS, D. G. de; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 432-436, 1995.

MELO, D. S. **Produção in vitro de embriões derivados de oócitos obtidos em diferentes fases da onda folicular de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 42 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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 cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MONDADORI, R. G.; LUQUE, M. C. A.; SANTIN, T. R.; BÁO, S. N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 323–333, 2007.

MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDELIS, A.A.G.; PORFÍRIO, E.P.; BÁO, S.N. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 33-37, 2010.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicular wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, p. 408, 2001.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 333-338, 1991.

NABHAN, T.; SATRAPA, R. A.; SIMÕES, R. A. L.; RAZZA, E. M.; PUELKER, R. Z.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos indicus x Bos taurus*) in tolerance to heat shock in bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 302, 2010.

NAGANO, M.; HISHINUMA, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. The relationship between oocyte morphology and ovarian status in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 953-958, 2007.

NANDI, S.; RAGHU, H. M.; RAVINDRANATHA, B. M.; CHAUHAN, M. S. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 65-74, 2002.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI BRIENZA, V. C.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G. A.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123-30, 2003.

NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. **Theriogenology**, v. 65, p. 1254–1264, 2006.

NOSEIR, W. M. B. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 50-55, 2003.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 179–195, 2004.

OHASHI, O. M.; SOUZA, J. S.; VALE, W. G.; SILVA, A. O. A. The use of assisted reproduction technology (art) in buffalo and zebu. In: FOLLOW-UP SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY FOR LATIN AMERICA, 4., 1998, Belém. [**Proceedings...**]. 1998. v.1, p.71-9.

PALTA, P.; CHAHUAN, M. S. Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 379-391, 1998.

PARKER, K. I.; ROBERTSON, D. M.; GROOME, N. P.; MACMILLAN, K. L. Plasma concentrations of inhibin a and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 822-828, 2003.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JR, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285–294, 2003.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PETYIM, S.; BAGÊ, R.; FORSBERG, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 449-463, 2001.

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

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, p. 495-504, 1984.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-697, 2009.

PRESICCE, G. A.; SENATORE, E. M.; BELLA, A.; de SANTIS, G.; BARILE, V. L.; de MAURO, G. J.; TERZANO, G. M.; STECCO, R.; PARMEGGIANI, A. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. **Theriogenology**, v. 61, p. 1343-1355, 2004.

PROMDIREG, A. ; ADULYANUBAP, W. ; SINGLOR, J.; NA-CHIENGMAI, A.; TECHAKUMPHU, M. Ovum pick-up in cycling and lactating postpartum swamp buffaloes (*Bubalis bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 145-149, 2005.

RAGHU, H. M.; NANDI, S.; REDDY, S. M. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 55-61, 2002.

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

REIS, P. O.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Effect of synchronization at the beginning of follicular wave emergence on OPU-IVP of Nelore (*Bos indicus*) and Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p. 764, 2010. Supplement, 2.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 265-277, 1995.

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

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, p. 1-16, 2001.

RODRIGUES, C. A.; MANCILHA, R. F.; REIS, E. L.; AVILA, L. G.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P.S. Emergência de nova onda de crescimento folicular em vacas holandesas de alta produção. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11., 2003, Salvador. [**Proceedings...**]. 2003. p. 91.

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**, v. 122, p. 737–744, 2001.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; NASSER, L. F.; TONHATI, H.; GARCIA, J. M.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; BARUSELLI, P. S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 51-59, 2009.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v. 123, p. 135–142, 2002.

SALAMONE, D. F.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. **Theriogenology**, v. 52, p. 549-561, 1999.

SALIBA, W. P. ; DRUMMOND, R. M. ; ALVIM, M. T. T. ; BARUSELLI, P.S. ; GIMENES, L.U.; LEITE, R. C. ; BASTIANETTO, E. ; GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo (preliminary results). In: SIMPÓSIO DE BÚFALOS DAS AMÉRICAS E IV EUROPE AND AMERICA'S BUFFALO SYMPOSIUM, 5., 2009, Pedro Leopoldo. [**Anais...**]. 2009, p. 126.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

SAS for Windows. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Versão 8.0. Cary: SAS, 2000.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.



SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.

SIMPSON, R. B., CHASE JR., C. C., SPICER, L. J., VERNON, R. K., HAMOND, A. C., RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 483–492, 1994.

SINGHAL, S.; PRASAD, S.; SINGH, B.; PRASAD, J. K.; GUPTA, H. P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 44-50, 2009.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308-317, 1988.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. Illinois: International Embryo Transfer Society Inc, 1998. 180 p.

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

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. **Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TY, L. V.; CHUPIN, D. ; DRIANCOURT, D. A. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 171-78, 1989.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M-T; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 47–56, 1997.

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.

VELAZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. doi: 10.1530/REP-08-0362

VIANA, J. H.; DE ALMEIDA CAMARGO, L. S.; DE MORAES FERREIRA, A.; DE AS, W. F.; DE CARVALHO FERNANDES, C. A.; DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas à recuperação de complexos *cumulus*-oócito por aspiração folicular. **Acta scientiae veterinariae**, v. 3, p. 1-4, 2005. Supplement,1.

VITTORIA, A. Anatomy of the female genital tract in the buffalo. In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 3., 1997, Casserta, Italy. [Proceedings...], 1997, p. 15-20.

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.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, p. 257-284, 1999.

WIT, A. A. C. de; 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. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1277-1283, 2000.

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

YANG, Y. B.; LU, K. H. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. **Theriogenology**, v. 33, p. 335, 1990.

ZEITOUN, M. M.; RODRIGUEZ, H. F.; RANDEL, R. D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 45, p. 1577-1581, 1996.

## ANEXOS

### ANEXO A – Solução de antibióticos para Solução Fisiológica 0,9%

Componentes	Laboratório – Código	q.s.p. 100 mL
Penicilina	Sigma P7794	0,003g
Penicilina	Sigma S9137	0,005g
Estreptomicina		0,0050 g
Neomicina	Sigma N 6386	0,010g
Solução salina filtrada		Completar 100mL

- Estocar a -80°C em alíquotas de 1 mL
- Adicionar 1mL em 1L de solução salina no momento do uso.

### ANEXO B - H199 (lavagem dos oócitos)

Componentes	Laboratório - Código	q.s.p. 5 mL
TCM 199 - Hepes	Gibco 12350-039	4,5mL
SFB	Gibco 10270-106	500µL
Amicacina		25µL
Piruvato		10µL

- Filtrar em membrana de celulose com poros de 0,22 µm

#### Estoque de Amicacina

Estoque-Mãe: 250 mg de amicacina/ 1 mL de H<sub>2</sub>O ultra-pura ou PBS. Fazer alíquotas de 200 µL e armazenar a -20oC

Estoque de uso: preparar uma solução na proporção 1: 15 (estoque-mãe: H<sub>2</sub>O ultra-pura ou PBS). Manter a 4oC.

**Estoque Piruvato**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>mM</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
Piruvato	Sigma P5280	0,2	0,1100g
Solução salina estéril			Completar 10mL

- Filtrar e estocar a -80°C em alíquotas de 40µL.

**ANEXO C – B199**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>q.s.p. 5 mL</b>
TCM 199 - Bicarbonato	Gibco 11150-059	4,5mL
SFB	Gibco 10270-106	500µL
Amicacina		25µL
Piruvato		10µL
LH		50µL
FSH		5µL
Filtrar em membrana de celulose (poros de 0,22)		
Estradiol		5µL

**LH (hCG)**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
HCG	Chorulon (5000 unidades)	1 frasco
TCM 199 - Bicarbonato	Gibco 11150-059	Completar 10 mL

- Estocar a -80°C em alíquotas de 60µL

**FSH**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
FSH	Folltropin (FSH-P)	0,0005 g
TCM 199 - Bicarbonato	Gibco 11150-059	Completar 10 mL

- Estocar a -80°C em alíquotas de 20µL

**Estradiol**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>q.s.p. 1,0 mL</b>
Estradiol	Sigma E8875	0,0010 g
Etanol absoluto		Completar 1,0 mL

- Estocar a  $-80^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de  $20\mu\text{L}$

**ANEXO D - Percoll 45 e 90%****Percoll 90%**

Homogeneizar os seguintes componentes:

- 0,0063 g de Bicarbonato de Sódio
- 2,7 ml de Percoll puro
- $300\mu\text{l}$  da solução 10X
- $6\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1M
- $12\mu\text{l}$  de  $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1M
- $11\mu\text{l}$  de Ácido Lático

**Percoll 45%**

Misturar 1 mL da solução de Percoll 90% com 1 mL de TALP SEMEN

**Solução 10X**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 100 mL</b>
KCl (1M)	3,09 mL
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M)	2,92 mL
NaCl	4,6750 g
Hepes ( <b>4034</b> )	2,3800 g
Água ultrapura	Completar 100 mL

- Ajustar o pH para 7,3.

- Filtrar e estocar a  $-80^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de 300 mL.

**Solução de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O → 1,0 M**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,4700 g
Água ultrapura	Completar 10 mL

- Filtrar e estocar a 4°C.

**Solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O → 0,1 M**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2030 g
Água ultrapura	Completar 10 mL

- Filtrar e estocar a 4°C.

**TALP SÊMEN**

<b>Componentes</b>	<b>mM</b>	<b>q.s.p. 100 mL</b>
NaCl	100 mM	0,5820 g
KCl	3,1 mM	0,0230 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,29 mM	0,0035 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,4 mM	0,0080 g
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	0,2100 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,1 mM	0,0300 g
Lactato de Sódio	35 mM	310, 4 µL
Vermelho Fenol		0,0010 g
Hepes (3784)	10 mM	0,2380 g
Água ultrapura		Completar 100 mL

- Dissolver em aproximadamente 90 mL de água ultrapura
- Homogeneizar e acertar o pH para 7,4-7,6
- Completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar a 4°C por 2 meses

**ANEXO E – FIV**

Homogeneizar e filtrar em seguida:

- 5 mL de FIV estoque
- 55µl de Heparina
- 220µl de PHE
- 25µl de amicacina
- 10µl de Piruvato

**Heparina**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
Heparina	0,0100 g
FIV estoque	Completar 10 mL

- Homogeneizar e estocar a -80°C em alíquotas de 60 µL.

**Solução PHE**

Penicilamina	10 mL
Hipotaurina	10 mL
Epinefrina	8 mL
Solução salina filtrada 0,9%	16 mL

- Homogeneizar e estocar a -80°C em alíquotas de 240 µL.

**Penicilamina**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
Penicilamina	0,0030 g
Solução salina filtrada 0,9%	Completar 10 mL

**Hipotaurina**

<b>Componentes</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
Hipotaurina	0,0011 g
Solução salina filtrada 0,9%	Completar 10 mL

## Epinefrina

Solução I:

Componentes	q.s.p. 10 mL
Lactato de sódio	0,1650 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (bissulfito de sódio)	0,0500 g
Água ultrapura	Completar 10 mL

- Homogeneizar e ajustar o pH da solução para 4,0.

Solução II:

Componentes	q.s.p. 40 mL
Epinefrina	0,00183 g
Solução I	Completar 40 mL

## FIV ESTOQUE

Componentes	mM	q.s.p. 10 mL
NaCl (S962S)	114mM	0,6660g
KCl	3,2mM	0,0238g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (S5761)	0,4mM	0,0048g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,5mM	0,0101g
NaHCO <sub>3</sub>	25mM	0,2100g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	20mM	0,0294g
Fenol C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>55</sub>		0,0010g
Lactato de Sódio	10mM	85,6µl
Água Mili Q autoclavada		Completar 100mL

- Dissolver em aproximadamente 90 mL de água ultrapura
- Homogeneizar e acertar o pH para 7,4-7,6
- Completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar a 4°C por 1 meses



**ANEXO F - B199 suplementado (maturação dos oócitos)**

<b>Componentes</b>	<b>Laboratório - Código</b>	<b>q.s.p. 5 mL</b>
Cistina 0,3mM		4,375mL
Cisteamina 50 $\mu$ M		50 $\mu$ L
SFB	Gibco 10270-106	500 $\mu$ L
Amicacina		25 $\mu$ L
Piruvato		10 $\mu$ L
LH		50 $\mu$ L
FSH		5 $\mu$ L
Filtrar em membrana de celulose (poros de 0,22)		
Estradiol		5 $\mu$ L

**Solução mãe de cistina (0,6 mM)**

- aquecer o TCM 199 NaHCO<sub>3</sub>
- pesar entre 2 e 2,5 mg de cistina (Sigma C6727) e fazer a proporção:  
 $18,793\text{mg} : 100\text{ml} = \text{mg de cistina pesada} : x$   
 $x = \text{mg de cistina pesada} * 100 / 18,793 = \text{ml de TCM NaHCO}_3 \text{ a se juntar na solução}$

**Solução 0,3mM de cistina**

- fazer uma proporção 1:1 da solução mãe de cistina: TCM NaHCO<sub>3</sub> (usar 3ml de cada, para fazer 5 ml de B199) e filtrar

**Solução mãe de cisteamina (100  $\mu$ M)**

- pesar entre 4 e 6 mg de cisteamina (Sigma M6500) e fazer a proporção:  
 $113,6\text{mg} : 100\text{ml} = \text{mg de cisteamina pesada} : x$   
 $x = \text{mg de cisteamina pesada} * 100 / 113,6 = \text{ml de TCM NaHCO}_3 \text{ a se juntar na solução}$

**Solução 50 $\mu$ M de cisteamina**

- fazer uma proporção 1:1 da solução mãe de cisteamina: TCM NaHCO<sub>3</sub> (usar 1ml de cada, para fazer 5 ml de B199) e filtrar

**ANEXO G - Hialuronidase 2%**

- 0,02g hialuronidase
- 0,04g BSA
- PBS sem Ca e Mg - q.s.p. 10ml

Homogeneizar, filtrar e armazenar a 4°C. Pré-aquecer 15 min (37-38°C) antes do uso.

**ANEXO H – SOF**

Homogeneizar e filtrar:

- 5mL SOF estoque
- 100µL SFB
- 0,03g BSA
- 100µL BME
- 50µL MEM
- 25µL amicacina
- 10µL estoque piruvato

**SOF ESTOQUE**

<b>Componentes</b>	<b>mM</b>	<b>q.s.p. 10 mL</b>
NaCl	107,5mM	0,6280g
KCl	7,1mM	0,0532g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	24,8mM	0,0100g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2mM	0,0162g
NaHCO <sub>3</sub>	1,7mM	0,2080g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,0mM	0,0254g
Lactato de Sódio	1,5mM	62µl
Hepes (3784)	10,0mM	0,2380g
Glicose	0,5mM	0,0270g
Vermelho Fenol		0,0010g
Água ultrapura		q.s.p. 100mL

- Dissolver em aproximadamente 90 mL de água ultrapura
- Homogeneizar e acertar o pH para 7,4-7,6
- Completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar na geladeira por 1 mês