



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM O USO DE  
FSH SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO OVOCITÁRIA E  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI.**

**GEORGE HENRIQUE LIMA MARTINS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO 101/2014**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO/2014**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM O USO DE FSH SOBRE A TAXA  
DE RECUPERAÇÃO OVOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA  
RAÇA SINDI.**

**ALUNO: George Henrique Lima Martins**

**ORIENTADOR: Dr. Ivo Pivato**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA / DF  
MARÇO/ 2014**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARTINS, G.H.L **Efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre a taxa de recuperação ovocitária e produção *in vitro* de embriões na raça Sindi.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014, 46p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passada a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

MARTINS, George Henrique Lima. **Efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre a taxa de recuperação ovocitária e produção *in vitro* de embriões na raça Sindi.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2014, 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2014.

1. Bovinos. 2. Estimulação ovariana. 3. Fecundação in vitro. 4 .Sindi. I. Martins, G. H. L. II. Título.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM O USO DE FSH SOBRE A TAXA  
DE RECUPERAÇÃO OVOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA  
RAÇA SINDI.**

**GEORGE HENRIQUE LIMA MARTINS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**IVO PIVATO, Doutor (FAV/UnB)  
(ORIENTADOR)**

---

**RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, Doutor (FAV / UNB)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**CARLOS FREDERICO MARTINS, Doutor (Embrapa Cerrados)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA, 25 de MARÇO de 2014.**

Dedico este trabalho a minha família, aos meus pais, Alísio Vasconcelos Martins e Maria do Socorro de Lima Martins, aos meus irmãos Janaína Lima Martins e José Martins de Vasconcelos Sobrinho, meus alicerces para toda vida e aos meus sobrinhos João Mário, Leonel e Thiago que trazem a alegria para toda família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior que me ilumina e me guia.

A minha família, por todo apoio, compreensão pelos dias ausentes e confiança depositada em mim.

A meu orientador Dr. Ivo Pivato, e ao pesquisador Carlos Frederico Martins, a quem admiro como exemplos de pessoa, caráter, humildade e respeito ao próximo. Por todo apoio, ensinamentos e companheirismo durante toda realização do projeto. Por terem acreditado em mim e me mostrado o caminho da pesquisa científica.

Ao Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira por ter aceitado o convite e fazer parte da banca contribuindo assim para o aprimoramento do trabalho.

A amiga e Técnica de Laboratório Heide Bessler, que não mediu esforços para que o trabalho fosse realizado e dedicou-se inteiramente ao mesmo.

Aos amigos Álvaro Fonseca, Andrielle Cunha, Carol Gonzales, Bruno Pio, Diego Carneiro, Elisa Ribeiro, Sebastião Godoy, Silvano Bonfim, por terem participado efetivamente da realização desse projeto, pela convivência diária e por tonarem meus dias mais felizes.

A Allice Rodrigues Ferreira e família, Seu Leo, Dona Marina e Alinne, por todo carinho, respeito e apoio durante todos esses anos e pelo incentivo para realização do mestrado.

Aos funcionários do CTZL Cléber, Seu Luíz, Dona Marlene, Wagner, e equipe de apoio Carlão, Fernando, Kelly e Zetinha pelo apoio durante a realização do projeto.

Aos amigos Cida, Renato e Vanessa pelo carinho e pelo apoio com a dissertação.

A Dra. Concepta Margaret Macmanus Pimentel pelo apoio com a estatística do experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais e a Universidade de Brasília pelo curso ofertado.

A Embrapa Cerrados-CTZL pelo apoio logístico e financiamento de toda pesquisa e a Fazenda São José pela disponibilização dos animais ao CTZL.

## INDICE

CAPÍTULOS/SUBCAPÍTULOS	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivos.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 A Raça Sindi.....	6
2.2 Produção <i>In Vitro</i> de Embriões.....	7
2.2.1 Maturação <i>in vitro</i> .....	8
2.2.2 Fecundação <i>in vitro</i> .....	9
2.2.3 Cultivo embrionário <i>in vitro</i> (CIV).....	10
2.3 O Papel da Maturação Ovocitária na Produção de Embriões.....	11
2.3.1 Maturação nuclear.....	13
2.3.2 Maturação citoplasmática.....	13
2.3.3 Maturação molecular.....	15
2.3.4 Competência ovocitária.....	15
2.3 Estimulação Hormonal.....	17
3 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 2.....	25
1 RESUMO.....	26
2. ABSTRACT.....	28
3. INTRODUÇÃO.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Delineamento Experimental.....	31
4.2 Reagentes.....	33
4.3 Produção de Embriões <i>In Vitro</i> .....	33
4.3.1 Recuperação das estruturas.....	33
4.3.2 Seleção e classificação de ovócitos.....	34
4.3.3 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos (MIV).....	35
4.3.4 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	35
4.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIV).....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## RESUMO

### **EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM O USO DE FSH SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO OVOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI.**

George Henrique Lima Martins<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade de Brasília

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH, sobre a maturação e competência, de ovócitos obtidos por aspiração transvaginal guiada por ultrassom, bem como sobre as taxas de clivagem e de produção de blastocisto na raça Sindi. Três tratamentos foram utilizados para produzir ovócitos parcialmente maturados *in vivo*, sendo T1 remoção do folículo dominante (RFD) com uso de doses múltiplas de FSH [RFD+FSH(m)], T2 remoção do folículo dominante e FSH em dose simples [RFD+FSH(s)] e TC ou grupo controle sendo realizada apenas a remoção do folículo dominante e *Ovum Pick Up* (OPU) [RFD-OPU]. Foram utilizadas 14 vacas cíclicas, vazias, não lactantes da raça Sindi, divididas em três grupos experimentais, sendo um para cada tratamento, sob regime de aspiração semanal, por período de cinco semanas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os animais dos três grupos receberam um dispositivo intravaginal de progesterona no início de cada tratamento, sendo retirado no momento da OPU. O número de folículos aspirados por vaca não diferiu entre os grupos com FSH, havendo diferença estatística apenas entre os grupos T2 e TC, sendo T2 superior a TC (11,36±1,39; 12,52±1,81 e 8,7±0,74 respectivamente) (P<0,05). Para o número de Complexos Cumulus Ovócitos (CCOs) recuperados por vaca, T1 (9,76±1,32) e T2 (9,81±1,83) não diferiram entre si, mas ambos foram superiores a T3 (6,3±0,82) (P<0,05). O número de ovócitos maturados foi superior para os grupos com FSH, mas houve semelhança entre os grupos T1 e TC (6,72±1,04; 7,33±1,32 e 4,45±0,51) (P<0,05). Para taxa de clivagem e média de embriões produzidos não houve diferença significativa (P<0,05). Os tratamentos com FSH foram eficientes para melhorar o número de folículos aspirados, número de CCOs recuperados e o número de ovócitos maturados. Também foi observado nesses grupos um maior número de folículos de 3-8mm, mostrando uma eficiência na resposta estimulatória, porém os valores das taxas de clivagem (87%, 74% e 69%, respectivamente para T1, T2 e TC) e de blastocisto (33%, 35% e 32%, respectivamente para T1, T2 e TC) não diferiram entre si (P<0,05). O uso de FSH nos dois regimes de aplicação (única e múltipla aplicação) foi capaz de aumentar o número de folículos, o número de estruturas aptas à maturação, mas não foi eficaz em



promover a aquisição da competência ovocitária refletida nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Palavras chave: *Bos indicus*, *Coasting*, Fecundação in vitro, *Ovum pick up*.

## ABSTRACT

### EFFECT OF OVARIAN STIMULATION USING FSH ON THE RECOVERY OOCYTE RATE AND EMBRYO IN VITRO PRODUCTION IN SINDI BREED

George Henrique Lima Martins<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade de Brasília

The objective of this study was to evaluate the effect of ovarian stimulation using FSH before ovum pick up in Sindhi Cows to improve the maturation and competence of oocytes, as well as increase the cleavage rate and blastocyst production. Three treatments were used to induce *in vivo* oocyte maturation, T1 [DFR + FSH (m)]: Dominant follicle removal followed by multiple injection of FSH; T2 [DFR + FSH (s)] dominant follicle removal followed by single injection of FSH; T3 [DFR-OPU] dominant follicle removal and OPU. Fourteen non-pregnant and non lacting cycling Sindhi cows were used in a completely randomized experimental design. Animals were divided in three groups (T1, T2 e T3) and had their ovaries aspirated weekly for five consecutive weeks. At the begin of each week animals from three groups received an intravaginal progesterone device. The number of aspirated follicles per cow did not differ between the groups with FSH, but T2 group was statistically higher than T3 (11.36±1.39, 12.52±1.81 and 8.7±0.74, respectively for T1, T2 and T3), (P<0.05). The number of oocytes retrieved per cow was similar between T1 (9.76±1.32) and T2 (9.81±1.83) but lower in T3 (6.3±0.82), (P<0.05). The number of matured oocytes was higher for the groups with FSH, but there was similarity between DFR + FSH (m) and DFR-OPU (6.72±1.04, 7.33±1.32 and 4.45±0.51 matured oocytes, respectively), (P<0.05). There was no difference in the cleavage and blastocyst rates in all groups produced no significant difference (P<0.05). FSH treatments increased the number of follicles aspirated, number of oocytes retrieved and the number of matured oocytes. In these groups was also observed a greater number of follicles 3-8 mm than group without FSH, showing efficiency in stimulatory response. However, the cleavage rate (87%, 74% and 69% of cleavaged embryos, respectively to T1, T2 and T3) and blastocyst rate (33%, 35% and 32% of blastocyst to T1, T2 and T3) did not differ between the groups. The use of FSH multiple or single application was able to increase the number of follicles, the number of structures suitable for maturation, but was not effective in promoting the acquisition of oocyte competence, reflected in the cleavage and blastocyst rates.

Keywords: Bos Indicus, Coasting, In vitro fertilization, Ovum Pick Up.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Representação esquemática dos protocolos hormonais utilizados em cada grupo experimental, sendo T1 (RFD+FSH em aplicações múltiplas), T2 (RFD+FSH em dose simples), T3 (RFD-OPU), DFR (remoção do folículo dominante), ↓P4 (colocação de implante intravaginal de progesterona), ↑P4 (retirada do implante intravaginal de progesterona), OPU (ovum pick up).....32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 – Distribuição média do número de folículos aspirados de vacas Sindi (*Bos indicus*) estimuladas com FSH em diferentes protocolos, de acordo com o tamanho dos folículos, com respectivos erros padrão da média (n=721).....38

Tabela 2.2 – Respostas por animal, em vacas Sindi (*Bos indicus*), sob regime de aspiração semanal, estimuladas com FSH em diferentes protocolos.....39

Tabela 2.3 – Taxas de recuperação dos CCOs, clivagem e de blastocisto em vacas Sindi, sob regime de aspiração semanal após estimulação com FSH (Folltropin®-V) em doses simples ou múltiplas, seguido por diferentes períodos de restrição (coasting).....41

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

µg	Micrograma
µl	Microlitro
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CCOs	Complexos Cumulus Ovócitos
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CIV	Culivo <i>in vitro</i>
D	Dia
eCG	Gonodotrofina coriônica equina
EP	Erro padrão da média
FSH	Hormônio Folículo estimulante
g	Força gravitacional
GC	Grânulos corticais
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GV	Vesícula germinativa
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
IAN	Instituto Agronômico do Norte
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LH	Hormônio Luteinizante
M	Metáfase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mM	Milimolar
MPF	Fator promotor de maturação
OPU	Ovum Pick-UP (Aspiração follicular)
PBS	Phosphate buffered saline
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKC	Proteína quinase C
RFD	Remoção do folículo dominante
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SOFacci	Meio de fluido oviduto sintético com aminoácidos, citrato de sódio e mio inositol
T	Tratamento
TALP	Tyreode-albuminalactato-piruvato
TCM	Tissue culture medium
TE	Transferência de Embriões
TMZ	Transição materno zigótica
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
UI	Unidades Internacionais
ZP3	Receptor de membrana da zona pelúcida do ovócito

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

O surgimento da aspiração folicular *in vivo* ou OPU (*ovum pick up*) e o aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* tornaram viável à aplicação da produção *in vitro* de embriões PIVE em escala comercial. Os índices atuais de blastocistos obtidos com a técnica de PIVE giram em torno de 20 a 50% (média de 35%) (Sirard et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Baruseli, 2012). Tal processo provou ser confiável, simples, pouco invasivo, repetível e eficiente para a obtenção de ovócitos de vacas vivas (Galli et al., 2001). A associação entre OPU e PIVE permite a aceleração do ganho genético, da transmissão das características produtivas e fornece as bases para o desenvolvimento de outras tecnologias como a clonagem e a transgenia (Garcia & Salaheddine, 1998; Aller et al., 2010).

Segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) apresentados por Strud (2012), em 2011, 572.432 embriões bovinos coletados *in vivo* foram transferidos no mundo, dos quais 54% foram transferidos após congelação e descongelação. Além disso, 373.836 embriões produzidos *in vitro* foram transferidos, sendo que 85% destes foram no Brasil. A PIVE no Brasil em 2011 aumentou 20% em relação a 2010, resultando em 318.116 embriões transferíveis, embora no mundo a produção de embriões *in vitro* tenha caído 1%. O país é responsável por 86% do total de PIVE no mundo. Em 2011, 53.019 sessões de OPU foram realizadas, produzindo uma média de 15 ovócitos e seis embriões por sessão.

Essa grande produção de embriões *in vitro* no Brasil pode ser explicada pela utilização de doadoras *Bos indicus*, as quais apresentam um número elevado de folículos antrais (Pontes et al., 2009). A raça pode exercer grande influência nesse aspecto, principalmente quando se compara *Bos indicus* e *Bos taurus*. Sabe-se que vacas *Bos indicus* têm de 3 a 4 vezes mais folículos antrais e ovócitos do que vacas *Bos taurus* (Pontes et al., 2009 e 2011; Silva-Santos et al., 2013).



Embora a raça apresente um número elevado de folículos, as taxas de blastocistos giram em torno de 35%. Apesar de satisfatórios esses números estão aquém do que a técnica é capaz de oferecer. O aumento da eficiência da PIVE está ligado entre outros fatores, ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação *in vitro* de ovócitos, condição de transporte entre as fazendas onde os ovócitos são coletados e os laboratórios, o desenvolvimento de métodos simples de incubação e criopreservação de ovócitos e embriões, ampliando o raio de ação dos laboratórios e a difusão da técnica (Gonçalves et al., 2007).

Os maiores problemas que impedem o avanço e a melhoria dos sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos relacionam-se à relativa escassez de conhecimento em como o ovócito adquire a competência durante o processo de maturação (Caixeta & Dode, 2010). Quando ovócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* são comparados aparentemente não existe diferença na maturação nuclear, nas taxas de fecundação e clivagem (Van de Lemput et al., 1996), entretanto uma significativa diferença é observada na competência entre esses ovócitos para produção de blastocistos, o que sugere a existência de diferenças na maturação citoplasmática entre os mesmos (Sirard et al., 1999; Rizos et al., 2002; Sirard et al., 2006; Caixeta & Dode, 2010).

A indução da diferenciação folicular pela manipulação do protocolo de estimulação ovariana, como por exemplo, pela privação de FSH ou *coasting*, após o tratamento estimulatório resultou na recuperação de ovócitos mais competentes, sendo, a maioria, capaz de se desenvolver até o estágio de blastocisto (Blondin et al., 2002). Esse período de privação de FSH induziria o início do processo de atresia, que enviaria um sinal para que o ovócito adquirisse competência (Sirard et al., 2006).

Uma grande quantidade de estudos tem buscado doses adequadas, duração dos protocolos, momento ideal da janela de estimulação por FSH e o pico de LH até o momento da aspiração, entre outros fatores (Sirard et al., 1999; Blondin et al., 2002; Chaubal et al., 2006; Chaubal et al., 2007; Aller et al., 2010; Nivet et al., 2012), no intuito de maximizar a produção *in vitro* de embriões, com a melhora da qualidade e a quantidade de ovócitos recuperados. No entanto, em função das diferentes respostas entre raças, momento do ciclo para o início do tratamento, momento do ciclo produtivo (lactantes ou não), idade da doadora, existem respostas distintas quando da administração dos tratamentos.

Até o momento não existe um protocolo estabelecido que maximize a aquisição da competência dos ovócitos, principalmente nas raças zebuínas. Estratégias para

tornar um maior número de ovócitos competentes no momento da OPU são fundamentais e poderão aumentar as taxas de blastocistos provenientes dessas estruturas, proporcionando uma melhor utilização das técnicas de reprodução assistida (TRA) como PIVE, clonagem e transgenia.

## 1.1 Objetivos

Avaliar o efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre as taxas de recuperação ovocitária, as taxas de clivagem e de produção de blastocistos na raça Sindi, também desenvolver um protocolo simples e eficaz pré-OPU, para obtenção de ovócitos de melhor qualidade e conseqüentemente aumento na produção de embriões.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Raça Sindi

A raça Sindi é originária da Ásia, mais especificamente da região de Kohistan na província de Sindi, hoje pertencente ao Paquistão. Esta é uma região de vales cercados por grandes cordilheiras que se estendem no sentido norte sul, predominando áreas de clima semiárido com temperaturas médias de 17 a 20°C (existindo picos extremos durante o ano de mínimas de 1,6 e máximas de 48°C), precipitações anuais de 250 a 300 mm, solo arenoso e pedregoso e vegetação lenhosa com o desenvolvimento de algumas gramíneas no período das chuvas (Santiago, 1985; Santos, 1990; Leite, 2001).

Na Índia, o Sindi é considerado uma raça leiteira, sendo os machos utilizados também para tração de carroças e arados. Seu contingente no Paquistão é de aproximadamente três milhões de indivíduos, o que torna a raça mais criada entre todas as de seu grupo, inclusive a Sahiwal (Khan, 2008).

A raça tem sua chegada ao Brasil em importações comerciais ocorridas em 1930 e, oficialmente, no ano de 1952 em importação para o Instituto Agrônomo do Norte (IAN), onde formou rebanho que se manteve por cerca de 20 anos. Após esse período, os animais da raça foram distribuídos por varias partes do país, mas hoje, grande parte de seu contingente encontra-se em rebanhos na região Nordeste, principalmente por sua boa adaptação as características edafoclimáticas locais (Mariz, 2010).

O gado Sindi apresenta como características principais pelagem de cor avermelhada, ideal para as regiões tropicais e sub-tropicais, o seu pequeno porte, também considerado ideal pelo melhor aproveitamento por área, além do menor consumo absoluto de alimentos, a boa eficiência reprodutiva e principalmente a boa capacidade de produção de

leite, tanto em quantidade como em qualidade. Além destas vantagens sobressai a sua excelente adaptabilidade às condições adversas de clima e de manejo, principalmente alimentar, nas condições de semi-árido nordestino (Teodoro et al., 2002).

Baseando-se nas informações disponíveis no banco de dados da Embrapa Gado de Leite, a média da produção de leite de 256 animais avaliados foi de 2.214 kg, com duração média de 274 dias de lactação, enquanto que a idade média ao primeiro parto foi de 1.160 dias e o intervalo médio entre partos de 457 dias (Teodoro et al., 2002).

Segundo Mariz (2010), a raça Sindi apresenta aptidão tanto para corte, quanto para leite, e é adaptada a condições adversas, como temperaturas elevadas e escassez de alimentos. O rebanho no Brasil é estimado em aproximadamente 6000 cabeças.

A utilização de técnicas de reprodução assistida (TRA) bem como um maior número de pesquisas científicas, se fazem necessários para que haja um aumento do número de indivíduos desta raça, visando o melhoramento genético e a manutenção desse grupamento.

## **2.2 Produção *In Vitro* de Embriões**

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante biotécnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos domésticos de interesse econômico. Essa biotécnica pode ser utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões (TE) (Gonçalves et al,2007).

A utilização dessa biotecnologia possibilita aumentar o número de produtos por doadora de alto mérito genético, permitindo reduzir o intervalo entre gerações, fator esse importante para o melhoramento genético dos rebanhos (Yang et al, 1998), com isso elevando o ganho genético de 2% ao ano com a inseminação artificial para 2,5% (Vishwanath, 2003).

Gonçalves (2007) relata que bezerras ao nascimento possuem mais de 100.000 ovócitos em seus ovários, que pelas vias naturais podem gerar 0,01% de produtos viáveis, totalizando por volta de dez descendentes durante a vida reprodutiva. Segundo Gonçalves et al, (2002) uma fêmea bovina seria capaz de produzir 50 a 100 embriões por ano, com um regime de duas aspirações semanais por doadora, durante vários meses.

A produção *in vitro* de embriões compreende três etapas desenvolvidas em laboratório: a maturação ovocitária *in vitro* (MIV), a fecundação dos ovócitos *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados.

### 2.2.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Para que o ovócito seja capaz de ser fecundado e posteriormente se desenvolver até o estágio de blastocisto, ele precisa ser maturado e, durante essa fase, sofrer diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo (Gonçalves, 2007). Ovócitos obtidos para o processo de PIVE, geralmente com diâmetro entre 2 e 8 milímetros, após serem retirados do seu ambiente folicular, tem seu processo de maturação nuclear iniciado. Faz-se necessário que a continuidade do processo de maturação seja realizada *in vitro* (Sirard, 1992; Dode, 2002).

O meio *Tissue Culture Medium* (TCM) é utilizado pela maioria dos laboratórios como meio de maturação *in vitro* para ovócitos bovinos (Varago et al., 2008). Este meio base é modificado de acordo com cada laboratório, sendo geralmente adicionado de piruvato, lactato, aminoácidos, bicarbonato de sódio, vitaminas, entre outras substâncias geralmente nas concentrações encontradas no soro sanguíneo. A suplementação com o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são de extrema importância, enquanto a suplementação de estrógeno nos meios MIV é opcional de cada laboratório (Gonçalves et al., 2002; Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Segundo Dode et al. (2002) e Gali et al.(2003) as condições de maturação na grande maioria dos laboratórios são a utilização do meio TCM-199 com sais de EARLE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino e gonadotrofinas (FSH e LH), em 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38°C por um período de 20-24h de incubação. Neste período os ovócitos completam seu processo de maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e podem então serem fecundados.

### 2.2.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os ovócitos tenham sofrido maturação completa, que os espermatozoides tenham sido apropriadamente preparados e que os mesmos se encontrem em um ambiente adequado (Dode & Rumpf, 2002).

A capacitação espermática ocorre pela remoção dos fatores decapacitantes presentes no plasma seminal, basicamente proteínas e outras substâncias que recobrem a membrana do espermatozoide. Neste processo, as principais alterações são bioquímicas e constituem-se na remoção do colesterol, a qual eleva a fluidez da membrana espermática, entrada de  $Ca^{++}$  intracelular, aumento da concentração de AMPcíclico e alterações de atividades enzimáticas, tal como da proteína quinase C (PKC) envolvida no mecanismo de transdução de sinais que irão desencadear a reação acrossômica (White & Aitken, 1989).

Estas alterações bioquímicas promovem uma alteração transitória no padrão de motilidade espermática, denominada hiperativação (Yanagimachi, 1994). Para completar o processo de capacitação, os espermatozoides hiperativados se ligam por meio de receptores da membrana plasmática (receptores ZP3) a proteínas específicas na zona pelúcida do ovócito de maneira a induzir a reação acrossômica (Flormam & First, 1988). A reação acrossômica é um processo de exocitose que libera enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e modificam as membranas da região pós-acrossomal, sítio da interação entre ovócito e espermatozoide (Sidhu & Guraya, 1989).

Após o descongelamento do sêmen, é necessário selecionar os espermatozoides vivos e capazes de fecundar. Esta seleção é realizada na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll (Galli & Lazzari, 1996), embora outros sistemas possam ser utilizados como o “*swim-up*” ou o lavado espermático. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática. Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final de 1 a  $5 \times 10^6$  espermatozóides viáveis/ml de meio (Gonsalves et al., 2002).

O meio mais usado para fecundação *in vitro* é o Tyrode-albuminalactato-piruvato (TALP), que contém em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina. Outros fatores importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio. O co-cultivo (espermatozoide e ovócito) é realizado por um período de 12

a 18 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (Dode et al., 2002; Gonçalvez et al., 2007).

A preparação seminal não é importante apenas para remoção do plasma seminal ou do crioprotetor, mas também para selecionar os melhores espermatozoides vivos na amostra a ser utilizada, além de remover agentes infecciosos e debris celulares (Dode et al., 2002).

### **2.2.3 Cultivo embrionário *in vitro* (CIV)**

Após a fusão do espermatozoide com o ovócito, ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pró-núcleo masculino. O pró-núcleo migra para o centro do ovócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem. Consequentemente, inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (Yanagimachi, 1994).

Os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecerão até atingirem o estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário é marcado pela primeira clivagem, a ativação do genoma embrionário no estágio de 8 a 16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 após a FIV. Após esse período os embriões estão aptos a serem transferidos para o útero das fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (Dode & Rumpf, 2002).

Os meios mais utilizados pelos laboratórios são os semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio (5% de O<sub>2</sub> em comparação aos 20% encontrados no ar atmosférico), sem co-cultivo em células somáticas (Mingoti, 2005). A atmosfera de cultivo, diferentemente daquela usada na maturação e na fecundação *in vitro*, passa a ser 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada a 39°C.

Entre os fatores benéficos da baixa tensão de O<sub>2</sub> no meio de cultivo *in vitro* pode-se destacar o aumento do diâmetro embrionário, do número de células da massa celular interna, da transformação de mórula para blastocisto e de blastocisto expandido para eclodido, melhora no aspecto geral do embrião, além da menor espessura da zona pelúcida, o que facilita a eclosão do embrião (Lim et al., 1999).



Os embriões permanecem no cultivo até o 7º dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos mesmos para a transferência ou criopreservação. Este pode se estender até o 8º ou 9º dia para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros (Gonçalves et al., 2002; Mingoti, 2005).

É esperado que, após a maturação *in vitro*, aproximadamente 90% dos ovócitos submetidos à maturação atinjam a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido, mostrando que o cultivo *in vitro* é o principal passo a determinar a eficiência do sistema e que muito deve ser feito para a melhoria dos resultados (Galli et al., 2001).

### **2.3 O Papel da Maturação Ovocitária na Produção de Embriões**

A maioria dos ovócitos coletados para PIVE está incluso em pequenos folículos antrais e, apesar de competentes para o reinício da meiose, apresentam baixa capacitação para o desenvolvimento embrionário. *In vivo*, a capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido às alterações moleculares e ultra-estruturais ocorridas no ovócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Hyttel et al., 1997). Quando ovócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* são comparados não existe diferença na maturação nuclear, nas taxas de fecundação e de clivagem (Leemput et al., 1996), entretanto, uma significativa diferença é observado na competência para produção de blastocistos entre esses ovócitos (Sirard et al., 1998; Sirard et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Caixeta & Dode, 2010).

A maturação *in vitro* parece ser o fator limitante, porque mesmo depois de uma cuidadosa seleção homogeneia de complexos *cummulos oophorus* (CCOs), apenas 35% vão atingir maturação citoplasmática completa e possuir competência para produzir um embrião viável para transferência (Blondin et al., 2002). Quando CCOs são maturados *in vivo* e então fertilizados e desenvolvidos *in vitro*, o potencial de desenvolvimento dos CCOs é aumentado apresentando uma porcentagem de blastócitos após 11 dias de 26,4±1 de blastocistos com

maturação *in vitro* para  $49,3 \pm 6,1$  de blastocistos maturados *in vivo* (Van de Leemput et al., 1999).

O folículo de origem do ovócito recuperado parece ser um fator determinante na obtenção de ovócitos com capacidade de produzir blastocistos morfolologicamente saudáveis, o que está associado normalmente com maiores taxas de prenhes (Sirard et al., 2006). Tal conhecimento permite supor que a competência pode ser adquirida em condições foliculares específicas.

As baixas taxas de blastocisto são determinadas por: 1) fatores ambientais e inerentes ao próprio sistema de PIVE de embriões, que atuam sobre todas as suas etapas (maturação, fecundação e cultivo); 2) remoção do ovócito do ambiente folicular, com consequente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre ovócito e células foliculares. A soma desses fatores determina o prejuízo na qualidade e competência ovocitária, levando à baixa produção de blastocistos, quando comparada àquela obtida *in vivo* (Gottardi & Mingoti, 2009).

Outras evidências demonstram que o potencial de desenvolvimento do ovócito pode ser significativamente influenciado pelas condições fisiológicas da doadora, tais como estágio do ciclo estral, estágio do desenvolvimento folicular, dentre outros (Lonergan & Fair, 2008).

Durante a maturação, os ovócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (Meinecke et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (Sirard et al., 1998), modificações moleculares, redistribuição das organelas intracelulares e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Kubelka et al., 2000). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose. Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Dessa forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o ovócito imaturo hábil à fecundação e ao desenvolvimento até embrião viável (De Sousa et al., 2004; Dekel, 2005).

### 2.3.1 Maturação nuclear

A maturação meiótica ou nuclear refere-se a progressão da meiose a partir do estágio de diplóteno da prófase da primeira meiose (prófase I) até a fase de metáfase II (M II) (Mingoti et al., 1995). É a cascata de eventos nucleares que ocorrem quando o ovócito é estimulado pelo LH pré-ovulatório, ou pela remoção do ovócito do seu ambiente folicular (Sirard, 2001).

Os ovócitos são mantidos no estágio de vesícula germinativa (GV) no ambiente folicular até que ocorra o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o que estimula a maturação do ovócito e induz a alterações fisiológicas na atividade das células do cumulus (Fair, 2003). Sob a influência dos hormônios gonadotróficos, o ovócito recomeça o ciclo celular a partir da fase de diplóteno da prófase I (estádio dictiatio), passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I (término da primeira divisão meiótica) e progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (Meinecke et al., 2001; Van de Hurk & Zhao, 2005).

No intervalo que compreende os estádios de prófase I a metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito, ocorre à quebra da vesícula germinativa (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (Meinecke et al., 2001; Jones, 2004). Na sequência, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que metade do número original de cromossomos permanece no ovócito (célula haploide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, o ovócito secundário. Após a maturação nuclear, o ovócito permanece nesse estágio do ciclo celular (M II) até a fecundação (Sirard, 2001).

### 2.3.2 Maturação citoplasmática

*In vivo*, a maturação do citoplasma em ovócitos é adquirida após uma série de processos preparatórios que envolvem a transcrição e consequente tradução de transcritos durante a prófase meiótica. A maioria dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) presentes no ovócito é sintetizada e acumulada durante o período de crescimento ovocitário (Wu et al.,

1996; Hyttel et al., 1997;). Isto ocorre porque a retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, o que resulta em um súbito bloqueio da transcrição nuclear e em profundas modificações no padrão de neossíntese proteica (Lonergan et al., 2003). Assim, até que a transcrição do DNA do embrião se torne ativa (o que ocorre após a transição materno-zigótica), o desenvolvimento do ovócito, zigoto e embrião de menos de 16 células dependem do pool de RNAm e das proteínas acumuladas para suportar todas as modificações bioquímicas, moleculares e estruturais do ovócito que ocorrem durante a maturação (Gandolfi & Gandolfi, 2001; Lonergan et al., 2003).

Marcantes alterações na síntese e fosforilação de proteínas são observadas no ovócito bovino e têm papel de ordenar a sequência de eventos que culminam com a maturação ovocitária (Wu et al., 1996). Ao longo da progressão da meiose durante a MIV de ovócitos bovinos, observam-se quatro fases de síntese proteica: proteínas necessárias para GVBD; para progressão até M I; para progressão até M II; e, finalmente, para manutenção em M II (Sirard et al., 1998).

As mitocôndrias possuem um papel extremamente importante dentro do contexto de maturação ovocitária, uma vez que são responsáveis pelo fornecimento de energia que é consumida durante o processo. A movimentação de mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia para os ovócitos e blastômeros de embriões durante períodos críticos do ciclo celular é essencial, bem como a eficiência da matriz mitocondrial na conversão do Piruvato em ATP (Gottardi & Mingoti, 2009).

Os grânulos corticais (GC) são formados nos ovócitos em crescimento, mas sua redistribuição ocorre no período da maturação (Hyttel et al., 1997). Inicialmente, os GC podem ser identificados em pequenos grupos (clusters) no citoplasma dos ovócitos em estágio de GV. Sua migração para a periferia do ovócito ocorre durante o avanço da maturação. Quando o ovócito atinge o estágio de M II, os GC estão distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (Velilla et al., 2004; Adona et al., 2008; citados por Gottardi & Mingoti, 2009). A exocitose dos grânulos corticais (reação cortical) é um dos mecanismos mais comuns utilizados pelo ovócito para evitar a poliespermia (Hyttel et al., 1997).

### 2.3.3 Maturação Molecular

Um aspecto importante durante o crescimento do ovócito é seu alto grau de atividade transcricional, portanto, mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência dos ovócitos. Os eventos moleculares se referem a essas modificações, que envolvem síntese, degradação e alterações de RNAm e proteínas, favorecendo o ovócito com o estoque molecular necessário para a fecundação e os eventos posteriores (Donnison & Pfeffer, 2004).

Um exemplo da maturação molecular, durante a maturação citoplasmática, é um aumento pronunciado na atividade das cinases, que iniciam uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica (Gottardi & Mingoti, 2009). As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5). A atividade da CDK é dependente da interação com uma ciclina, cujos níveis são regulados sequencialmente para assegurar que as fases do ciclo celular prossigam na ordem correta. Exemplos importantes de quinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Os ovócitos em crescimento desenvolvem primeiramente a habilidade de ativar o MPF e, posteriormente, de ativar a via MAPK. Somente os ovócitos com o crescimento completo possuem competência para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular (Motlik et al., 1998).

### 2.3.4 Competência ovocitária

A competência ovocitária é definida como a habilidade ou potencial de um ovócito passar pela maturação, ser fecundado, desenvolver até o estágio de blastocisto e ter a capacidade de induzir uma gestação (Sirard et al., 2006). Muitos fatores biológicos agem em conjunto para preparar o ovócito imaturo para que este seja competente e tenha um desenvolvimento adequado após a fecundação. Essa competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, por várias alterações celulares e moleculares que proporcionam ao ovócito capacidade para o desenvolvimento embrionário após a fecundação (Caixeta & Dode, 2010).

A aquisição da competência máxima do ovócito ocorre em grandes animais, incluindo vacas, entre as ondas de FSH e o momento do pico pré-ovulatório de LH, que por sua vez é a finalização de um longo processo preparatório para fecundação, ou ocorre espontaneamente quando os ovócitos são removidos dos seus folículos (Sirard et al., 2006).

A maioria dos ovócitos recuperados a partir de folículos antrais é capaz de completar a maturação nuclear, mas apenas os competentes são capazes de ter desenvolvimento embrionário normal, isto é, nem todos que completam a maturação nuclear têm a capacidade de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Essa diferença pode ser atribuída ao “status” de maturação citoplasmática e molecular que difere entre os competentes e incompetentes (Donnison & Pfeffer, 2004; Sirard et al., 2006).

A transcrição materna diminui marcadamente antes da maturação do ovócito, quando o folículo tem em torno de 3 mm (Fair, 2003). A partir deste ponto a transcrição continua em nível bem menor, sugerindo que as proteínas e transcritos que foram estocados não são substituídos, pelo contrário, são gradualmente traduzidos ou degradados até o momento da ativação do genoma embrionário, a transição materno-zigótica (TMZ), de forma a suprir as necessidades da fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Mourot et al., 2006; Lonergan et al., 2008).

Quando o ovócito atinge aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  ele tem competência para retomar a meiose e sofrer a quebra da vesícula germinativa, e com cerca de 110  $\mu\text{m}$  ele adquire a competência para completar a maturação até o estágio de metáfase II (Hyttel et al., 1997).

Existe ainda uma correlação evidente entre tamanho dos folículos e a competência dos ovócitos. Ovócitos provenientes de folículos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento do que os de folículos de menor diâmetro. Essa maior competência pode estar relacionada com maior diâmetro do ovócito, visto que existe uma correlação entre o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo e, conseqüentemente, com a capacidade de desenvolvimento (Fair 2003; Caixeta & Dode, 2010).

Ovócitos coletados em diferentes momentos após o pico de LH possuem um alto grau de competência para alcançar o estágio de blastocisto (Sirard, 2001). No entanto folículos subordinados também contém ovócitos com potencial de desenvolvimento relativamente elevado, medido pela taxa de blastocisto (Ghinder et al., 2000). Essa situação é possivelmente explicada por semelhanças entre a maturação do folículo dominante e a fase inicial da atresia folicular, que enviaria ao ovócitos sinais semelhantes aos enviados no início da maturação (Sirard et al., 1999). Concordando com essa hipótese Li et al. (2009), Nivet et

al. (2012) demonstraram que o início da apoptose em ovócitos imaturos é benéfico para competência e desenvolvimento do embrião pós fecundação.

A capacidade de desenvolvimento durante a primeira semana do embrião é claramente influenciada pelo status folicular a partir do qual o ovócito é obtido, indicando que este potencial de desenvolvimento é inerente a determinadas condições específicas de maturação. Como a maioria dos embriões bovinos que não atingem o estágio de blastocisto é bloqueada na fase de transição materno zigótica (TMZ), no estágio de oito a dezesseis células, pode-se especular que ovócitos incompetentes não conseguem ativar adequadamente o genoma embrionário (Sirard, 2001; Caixeta & Dode, 2010).

### **2.3 Estimulação Hormonal**

Nas últimas décadas inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos por meio da manipulação ovariana, com ênfase no desenvolvimento folicular e conseqüentemente ganho na qualidade do ovócito, nas taxas de blastocisto e de concepção em vacas. O controle do desenvolvimento folicular possui um impacto significativo sobre as TRAs (Baruselli et al., 2012).

Uma das estratégias para aumento da eficiência da técnica de OPU/PIVE é a estimulação ovariana com uso de gonadotrofinas. O crescimento folicular pode ser estimulado pelo uso de FSH, combinações FSH/LH, além de gonadotrofinas de égua prenhe (eCG), que são amplamente utilizados na transferência de embrião (TE). No entanto são necessárias modificações nas vias de administração, no momento da aplicação e nas dosagens para se atingir objetivo final da estimulação ovariana antes da OPU, que é gerar um maior número de folículos disponíveis para aspiração (De Roover et al., 2008). De fato, um maior número de folículos foi recuperado de vacas estimuladas em comparação com vacas não estimuladas em *Bos taurus* (Blondin et al., 2002). No entanto, o efeito da estimulação ovariana em *Bos Indicus* não foi confirmado (Monteiro et al., 2009; Reis et al., 2010).

A simples estimulação ovariana com o uso de FSH não é suficiente para que ocorra a competência do ovócito. De fato a estimulação ovariana com repetidas doses deste hormônio parece ser eficiente em promover o desenvolvimento de folículos grandes e saudáveis, a maturação desses ovócitos é estimulada, resultando em grande número de CCOs para aspiração, mas que aparentemente são incompetentes para o desenvolvimento

embrionário (Blondim et al., 2002). O que os estudos tem demonstrado é que além de uma estimulação hormonal, são necessários outros fatores para que haja tanto um maior número de CCOs, como de ovócitos competentes.

Tem sido demonstrado por diversos estudos que um tempo de restrição na suplementação de FSH antes da OPU (*coasting*), ou seja, entre a estimulação hormonal e a coleta das estruturas, pode afetar o desenvolvimento dos CCOs (Blondin et al., 2002, Chaubal et al., 2006, Chaubal et al., 2007, Nivet et al., 2012). Esse tempo de *coasting* induziria os ovócitos ao desenvolvimento de uma pseudominância, ou enviaria ao mesmo sinais de atresia, fornecendo aos CCOs um ambiente ideal para aquisição da competência. Essas condições seriam semelhantes, ou mimetizariam às encontradas momentos antes da ovulação.

A remoção do folículo dominante, momentos antes da OPU, tem demonstrado eficácia em aumentar o número de folículos no momento da OPU e o número de CCOs recuperados (Chaubal et al., 2006, Monteiro et al., 2009). Esta pode ser realizada através do processo de OPU, ou estimulada pelo uso de hormônios como GnRH ou estrógeno e progesterona em combinação (Bó et al., 2003). Assim um folículo que está prestes a regredir muda seu curso em prazo médio de 12 horas após a remoção do folículo dominante (Beg et al., 2002).

Chaubal et al. (2006), demonstraram que a retirada dos folículos médios e grandes (folículos >5mm), 72 horas antes da OPU, resultaram em números semelhantes para número de folículos, taxa de recuperação de CCOs, número de ovócitos maturados e taxa de blastocisto em D7 de quando esses animais foram estimulados com dose simples de FSH 30 horas antes da aspiração. Estes valores só eram inferiores quando os animais sofriam a ablação do folículo dominante e eram estimulados com FSH antes da OPU, demonstrando a potencialização dos dois efeitos.



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONA, P.R.; PIRES, P.R.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.; LEAL, C.L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.49-56, 2008.
- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; RIOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.119, p 1-8, 2010.
- BARUSELLI, P.S.; SA´ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BÓ, G.A.. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.134-141, 2012.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.;GINTHER, O.J. Follicle selection in a cattle: dynamics of follicular-fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120-126, 2002.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.;TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, n.66, p.38-43, 2002.
- 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.
- CAIXETA, S.C.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, p.8-18, 2010.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal trataments for increasing the oocyte and embryo production in na OPU-IVP system. **Theriogenology**, v.67, p.719-728, 2007.
- CHAUBAL, S.A; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; FERRE, L.B.; FABER, D.C.; BOLS P.E.J.; RIESEN, J.W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum

- pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v.65, p.1631-1648, 2006.
- DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.234, p.19-25, 2005.
- DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, C.H. Effects of Ovum Pick-Up frequency and FSH stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.239-245, 2008.
- DE SOUSA, P.A.; SILVA, S.J.M.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.375-385, 2004.
- DODE, M.A.M.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNADES, C.E. The effect of sperm preparation of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction science**, v.69, p. 15-23, 2002.
- DODE, M.A.M.; RUMPF, R. Produção in vitro de embriões em espécie bovina, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº26-Maio/Junho, 2002.
- DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology Reproduction**. v.71, p.1813-21, 2004.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.203-16, 2003.
- FLORMAN, H.M.; FIRST, N.L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. **Development Biology**, v.128, 453-463, 1988.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p. 599-616, 2003.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Jornal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.
- GANDOLFI, B.T.A.L.; GANDOLFI F. The maternal legacy to the embryo: 59 cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.
- GARCIA, A.; SALAHEDDINE M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspirations on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, v.50, p575-585, 1998.

- GHINTER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, v.62, p.920-927, 2000.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, Ed. Varela, v.1, 2002.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R. Produção in vitro de Embriões Bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, 2007.
- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z.; Maturação de ovócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.82-94, 2009.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- KHAN, M.S.; REHMAN, Z.; KHAN, M.A. et al. Genetic resources and diversity in Pakistani cattle. **Pakistan Veterinary Journal**, v.28, n.2, p.95-102, 2008.
- KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.
- LEITE, P.R.M.; SANTIAGO, A.A.; NAVARRO FILHO, H.R.. Sindi: gado vermelho para o semi-árido. **Ed. EMEPA – PB / Banco do Nordeste**, Joao Pessoa, 147p, 2001.
- LEEMPUT, E.E.; VAN DE VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, C.G.; DIELEMAN, S.J. Comparison of the developmental potential of in vivo matured bovine oocytes in an in vitro test system. **Theriogenology**, v.45, p.273, 1996 (Abstract)
- LEEMPUT, E.E.; VAN DE VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMAN, S.J. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.
- LI, H.J.; LIU, D.J.; CHANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved development potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.114, p. 89-98, 2009.
- LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Human Reproduction**, v.14, p.458-464, 1999.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos- Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animals**, v.38, p.259-67, 2003
- MARIZ, A.T.M. Caracterização zootécnica, estrutura populacional e índices reprodutivos da raça Sindi no Brasil. Areias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, **Tese de Doutorado**, p.102, 2010.
- MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction Domestic Animals**, v.36, p.183-188, 2001.
- MINGOTI, G.Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. **In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução**, Jaboticabal, SP: Funep, 2005.
- MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA E SILVA, A.A.M. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Braz J Med Biol Res**, v.2, p.213-217, 1995.
- MONTEIRO, F.M.; FERREIRA, M.M.G.; POTIENS, J.R.; EBERHARDT, B.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. **Reproduction Domestic Animal**, v.4, p.1-5, 2009.
- MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, v.49, p.461-469, 1998.
- MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.1367-79, 2006.
- NIVET, A.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELENGER, J.; VIGNEAUL, C. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model, **Reproduction Research**, v.143, p.165-171, 2012.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARRETOS, T.R.R.; OLIVEIRA J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparacion 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.
- PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.
- REIS, P.O.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Effect of synchronization of the follicular wave emergence on OPU-IVP of Nelore (*Bos indicus*) and Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **Acta Scienti Veterinaria**, v-38, p.385, 2010.

- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY,P.; BOLAND, M.P.; PATRICK LONERGAN, P. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development In Vitro Versus In Vivo: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.
- SANTIAGO, A.A. O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo. **Ed. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, Campinas-SP, 1985.744 p.
- SANTOS, R. O gado sagrado na Índia. **Ed. Agropecuaria Tropical**, Uberaba-MG, 1990. 350p.
- SHIDU, K.S.; GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **International Review of Cytology**, v.118, p.231-280, 1989.
- SILVA-SANTOS, K.C; MARINHO, L.S.R; SANTOS, G.M.G;MACHADO, F.Z.; GONZALES, S.M; LISBOA, L.A;SENEDA, M.M. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.180-186, 2013.
- SIRARD, M.A.; Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, B. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.37, p39-58, 1992.
- SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.; WARE, C.B. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v-39, p.546-552, 1988.
- SIRARD, M.A.; PICARD, L.;DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time intervalbetween FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.51, p. 699-708, 1999.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES ,M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v.65, p.126-36,2006.
- STROUD B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. **IETS Newlest**, v.50, p.16-25, 2012.
- TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; MARTINEZ, M.L. Raça Sindi : uma opção na produção de leite para o semi-árido brasileiro -**Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora-MG (edição online) out. 2002. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/melhoramento/Sindi/sindi.php>>. Acesso em 8 de fevereiro. 2014.

- VAN DE HURK, J.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicle. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p. 100-109, 2008.
- VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RIDRIGUEZ-GONZALES, E.; LOPES-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.507-514, 2004.
- VISHWANATH, R. Artificial inseminations in the state of the art. **Theriogenology**, v.59, p.571-584, 2003.
- WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v.22, p.163-77, 1989.
- WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.45, p.560-565, 1996.
- YANG, X; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J; PRESICCEI, G.A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. **Theriogenology**, v.49, p.471-482, 1998.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **The physiology of reproduction**. 2.ed. NewYork: Raven, p.189-317, 1994

## **CAPÍTULO 2**

## 1 RESUMO

### **EFEITO DA ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM O USO DE FSH SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO OVOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI.**

George Henrique Lima Martins<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade de Brasília

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH, sobre a maturação e competência, de ovócitos obtidos por aspiração transvaginal guiada por ultrassom, bem como sobre as taxas de clivagem e de produção de blastocisto na raça Sindi. Três tratamentos foram utilizados para produzir ovócitos parcialmente maturados *in vivo*, sendo T1 remoção do folículo dominante (RFD) com uso de doses múltiplas de FSH [RFD+FSH(m)], T2 remoção do folículo dominante e FSH em dose simples [RFD+FSH(s)] e TC ou grupo controle sendo realizada apenas a remoção do folículo dominante e *Ovum Pick Up* (OPU) [RFD-OPU]. Foram utilizadas 14 vacas cíclicas, vazias, não lactantes da raça Sindi, divididas em três grupos experimentais, sendo um para cada tratamento, sob regime de aspiração semanal, por período de cinco semanas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os animais dos três grupos receberam um dispositivo intravaginal de progesterona no início de cada tratamento, sendo retirado no momento da OPU. O número de folículos aspirados por vaca não diferiu entre os grupos com FSH, havendo diferença estatística apenas entre os grupos T2 e TC, sendo T2 superior a TC ( $11,36 \pm 1,39$ ;  $12,52 \pm 1,81$  e  $8,7 \pm 0,74$  respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Para o número de Complexos Cumulus Ovócitos (CCOs) recuperados por vaca, T1 ( $9,76 \pm 1,32$ ) e T2 ( $9,81 \pm 1,83$ ) não diferiram entre si, mas ambos foram superiores a T3 ( $6,3 \pm 0,82$ ) ( $P < 0,05$ ). O número de ovócitos maturados foi superior para os grupos com FSH, mas houve semelhança entre os grupos T1 e TC ( $6,72 \pm 1,04$ ;  $7,33 \pm 1,32$  e  $4,45 \pm 0,51$ ) ( $P < 0,05$ ). Para taxa de clivagem e média de embriões produzidos não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os tratamentos com FSH foram eficientes para melhorar o número de folículos aspirados, número de CCOs recuperados e o número de ovócitos maturados. Também foi observado nesses grupos um maior número de folículos de 3-8mm, mostrando uma eficiência na resposta estimulatória, porém os valores das taxas de clivagem (87%, 74% e 69%, respectivamente para T1, T2 e TC) e de blastocisto (33%, 35% e 32%, respectivamente para T1, T2 e TC) não diferiram entre si ( $P < 0,05$ ). O uso de FSH nos dois regimes de aplicação (única e múltipla aplicação) foi capaz de aumentar o número de folículos, o número de estruturas aptas à maturação, mas não foi eficaz em



promover a aquisição da competência ovocitária refletida nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Palavras chave: *Coasting*, Fecundação in vitro, *Ovum Pick Up*, Bos Indicus.

## 2 ABSTRACT

### EFFECT OF OVARIAN STIMULATION USING FSH ON THE RECOVERY OOCYTE RATE AND EMBRYO IN VITRO PRODUCTION IN SINDI BREED

George Henrique Lima Martins<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade de Brasília

The objective of this study was to evaluate the effect of ovarian stimulation using FSH before ovum pick up in Sindhi Cows to improve the maturation and competence of oocytes, as well as increase the cleavage rate and blastocyst production. Three treatments were used to induce *in vivo* oocyte maturation, T1 [DFR + FSH (m)]: Dominant follicle removal followed by multiple injection of FSH; T2 [DFR + FSH (s)] dominant follicle removal followed by single injection of FSH; T3 [DFR-OPU] dominant follicle removal and OPU. Fourteen non-pregnant and non lacting cycling Sindhi cows were used in a completely randomized experimental design. Animals were divided in three groups (T1, T2 e T3) and had their ovaries aspirated weekly for five consecutive weeks. At the begin of each week animals from three groups received an intravaginal progesterone device. The number of aspirated follicles per cow did not differ between the groups with FSH, but T2 group was statistically higher than T3 (11.36±1.39, 12.52±1.81 and 8.7±0.74, respectively for T1, T2 and T3), (P<0.05). The number of oocytes retrieved per cow was similar between T1 (9.76±1.32) and T2 (9.81±1.83) but lower in T3 (6.3±0.82), (P<0.05). The number of matured oocytes was higher for the groups with FSH, but there was similarity between DFR + FSH (m) and DFR-OPU (6.72±1.04, 7.33±1.32 and 4.45±0.51 matured oocytes, respectively), (P<0.05). There was no difference in the cleavage and blastocyst rates in all groups produced no significant difference (P<0.05). FSH treatments increased the number of follicles aspirated, number of oocytes retrieved and the number of matured oocytes. In these groups was also observed a greater number of follicles 3-8 mm than group without FSH, showing efficiency in stimulatory response. However, the cleavage rate (87%, 74% and 69% of cleavaged embryos, respectively to T1, T2 and T3) and blastocyst rate (33%, 35% and 32% of blastocyst to T1, T2 and T3) did not differ between the groups. The use of FSH multiple or single application was able to increase the number of follicles, the number of structures suitable for maturation, but was not effective in promoting the acquisition of oocyte competence, reflected in the cleavage and blastocyst rates.

Keywords: Bos Indicus, Coasting, In vitro fertilization, Ovum Pick Up.

### 3 INTRODUÇÃO

A raça Sindi é originária da Ásia, mais especificamente da região de Kohistan na província de Sindi, hoje pertencente ao Paquistão (Leite, 2001) e tem sua chegada ao Brasil nos anos de 1930 em importações comerciais e oficialmente no ano de 1950 em importação para o Instituto Agrônomo do Norte onde formou seu rebanho inicial (Mariz, 2010).

Segundo Mariz (2010), a raça Sindi apresenta aptidão tanto para corte, quanto para leite, e é adaptada a condições adversas, como temperaturas elevadas e escassez de alimentos. O rebanho no Brasil é estimado em aproximadamente 6000 cabeças e de acordo com informações disponíveis da Embrapa Gado de Leite, a raça possui média de produção de leite de 2214 kg, com duração média de lactação de 274 dias (Teodoro et al., 2002).

Inúmeras são as vantagens da utilização das TRAs como transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE). Podem ser citadas: a diminuição do intervalo entre gerações, aumento do número de descendentes de doadoras de alto mérito genético (Aller et al., 2010), suporte para outras tecnologias como a clonagem e a transgenia, ou a formação de banco de embriões para serem transferidos em vacas de alta produção em períodos de estresse calórico ou vacas repetidoras de cio (repeat breeders), (Baruselli et al., 2011; Nivet et al., 2012).

No ano de 2012, segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) o Brasil foi responsável por 85% das transferências de embriões produzidos *in vitro* no mundo (Stroud, 2012). No entanto, após inúmeros estudos nos últimos 30 anos do desenvolvimento das técnicas de maturação *in vitro* (Sirard et al., 1988), as taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto pela técnica de PIV não ultrapassam 40% (Ramos et al., 2010).

Considerando que aproximadamente 60-80% dos ovócitos maturados *in vivo* são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, comparado com

somente 25-40% dos maturados *in vitro*, pode-se sugerir que a maturação ainda é um dos problemas na PIVE (Caixeta & Dode, 2010).

O folículo de origem do ovócito parece ser um fator determinante no processo de maturação e aquisição da competência do mesmo (Blodin et al., 2002). A aquisição da competência do ovócito determina o potencial deste em passar pela maturação, ser fecundado, desenvolver até o estágio de blastocisto e ter a capacidade de induzir uma gestação (Sirard et al., 2006).

Uma possível maneira de se estimular a aquisição da competência seria uma modificação no regime de superovulação, permitindo que os ovócitos completem seu processo de maturação, seguido por um rápido crescimento folicular. A manipulação do crescimento folicular a partir da estimulação ovariana com o uso de FSH, seguido de um período de restrição ou *coasting*, foi responsável pelo aumento do número de ovócitos competentes, resultando em altas taxas de embriões produzidos *in vitro* (Blondin et al., 2002; Chaubal et al., 2007; Nivet et al., 2012). Este período de privação induziria um início da atresia, que enviaria um sinal para que o ovócito adquirisse a competência (Sirard et al., 2006).

Pouco se conhece sobre o potencial de produção de embriões *in vitro* na raça Sindi. Por ser uma raça em desenvolvimento no Brasil, faz-se necessário estratégias de melhoramento genético no sentido de evidenciar e aprimorar suas características produtivas. A aceleração da multiplicação em série por fecundação *in vitro* pode ser uma importante medida para o desenvolvimento da raça.

Neste contexto, este estudo objetivou comparar o efeito da estimulação ovariana momentos antes da aspiração folicular, com uso do hormônio FSH, seguido de um período de restrição, com aplicações múltiplas ou simples desse hormônio, sobre as taxas de recuperação de ovócitos, taxas de clivagem e de blastocistos produzidos *in vitro* em vacas da raça Sindi.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília com UnB/DOC n° 136522/2013.

### 4.1 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Campo Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com aptidão Leiteira-CTZL, pertencente ao Centro de Pesquisas Agropecuária do Cerrado-CPAC (Embrapa Cerrados), localizado as margens da DF 180, km 64 no Núcleo Rural Ponte Alta-Gama, Distrito Federal, com área total de 270 hectares. O experimento foi realizado no período de 15 de abril a 13 de maio de 2013.

Foram utilizadas 14 vacas secas e vazias da raça Sindi, com peso, idade e escore de condição corporal, respectivamente, de 400 quilos, seis anos e 3,75 (escore de 1-5). Os animais foram mantidos a pasto, em área de piquetes rotacionados de *Panicum maximum* Jacq. *vr. Mombaça*, com suplementação mineral e água *ad libitum* durante todo experimento.

Todos os animais foram submetidos à remoção do folículo dominante (RFD) no início dos tratamentos (todos os folículos maiores que 5mm de diâmetro foram aspirados). Em seguida foi realizada a colocação de implante intravaginal contendo 1,0g de progesterona natural (Cronipres®, Biogénesis-Bagó S.A., Buenos Aires, Argentina), sendo retirado apenas no momento de cada aspiração folicular (AF) e recebendo um novo implante após AF.

Os tratamentos foram compostos de: T1 (n=5) - Estimulação ovariana com 80mg de FSH (Folltropin®-V, Bioniche, Belleville, Ontário, Canadá), em aplicações múltiplas

(m), divididos em três doses decrescentes (30mg, 30mg e 20mg) por via intramuscular e com intervalo de 24 horas entre aplicações (D3, D4 e D5), sendo a última 54h antes da AF (D7) [RFD+FSH(m)]; T2 (n=5) - Estimulação ovariana com a mesma dose de FSH, porém em dose simples (s), sendo que a metade da dose (40mg) foi administrada por via subcutânea e a outra metade por via intramuscular 102h antes da AF, simultânea a primeira aplicação de FSH do grupo T1 (D3) [RFD+FSH(s)] e TC ou controle (n=4) - Remoção do folículo dominante em D0 e OPU em D7, sem estimulação ovariana [RFD-OPU], de acordo com o representado na figura 2.1. Para cada tratamento foram realizadas cinco sessões de aspirações com intervalo de sete dias entre as aspirações.

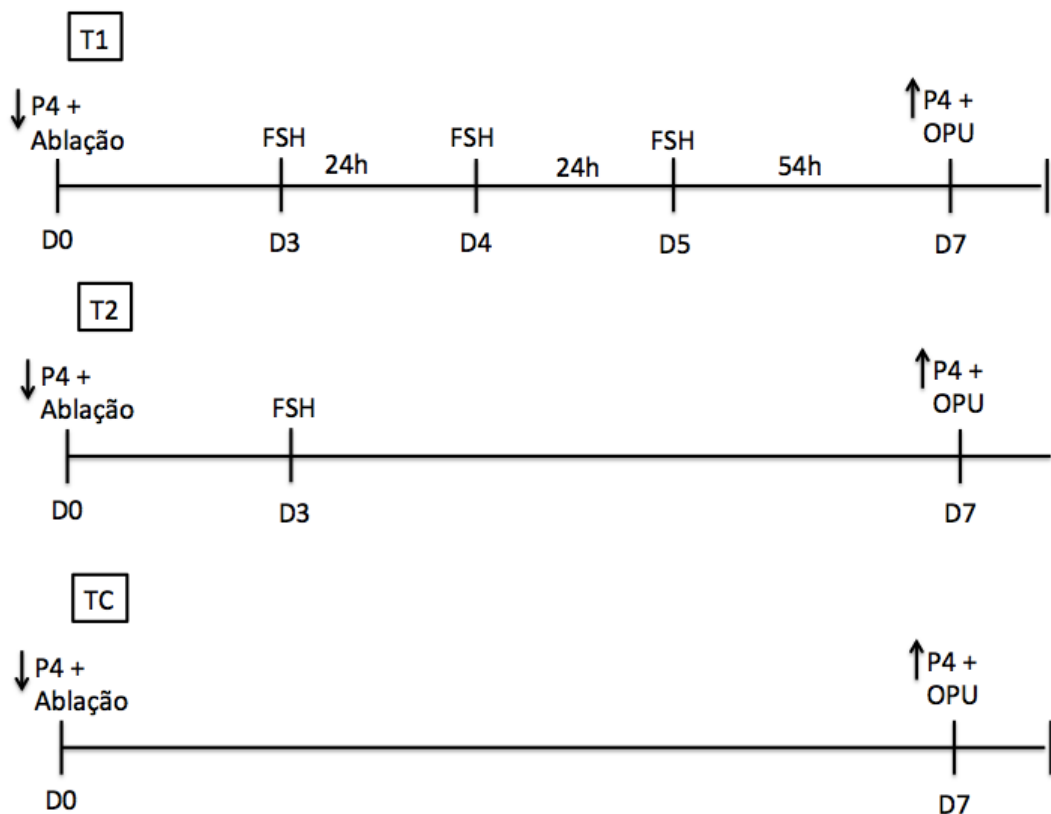


FIGURA 2.1. Representação esquemática dos protocolos hormonais utilizados em cada grupo experimental, sendo T1 (RFD+FSH em aplicações múltiplas), T2 (RFD+FSH em dose simples), T3 (RFD-OPU), DFR (remoção do folículo dominante), ↓P4 (colocação de implante intravaginal de progesterona), ↑P4 (retirada do implante intravaginal de progesterona), OPU (ovum pick up).

Previamente a aspiração folicular, todos os folículos visíveis foram contados e medidos e somente aqueles que apresentavam diâmetro acima de 3mm foram aspirados. De acordo com o diâmetro apresentado, os folículos medidos foram divididos em três grupos:

folículos <3,0mm, entre 3-8mm e folículos >8mm, levando-se em consideração o diâmetro ideal de 3-8mm para folículos destinados a OPU/PIV.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, três tratamentos e cinco repetições, sendo cada animal considerado uma unidade experimental. Para quantificar as variáveis de interesse os animais foram avaliados (aspirados) a cada período de sete dias. Para análise de variância adotou-se o animal, o tratamento hormonal e o período como variáveis de classe e o animal dentro do tratamento como fator aleatório, sendo testado à interação tratamento/ período, porém não foi significativo. Foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (2001). Realizou-se um teste de seleção de estruturas, utilizando o critério de informação bayesiano (BIC), para determinar o modelo que melhor representasse os dados. Quando observadas diferenças, as médias entre os tratamentos foram comparadas utilizando o recurso PROC GLM e o teste de Duncan, em 5% de probabilidade.

## **4.2 Reagentes**

Todos os meios utilizados para produção *in vitro* de embriões, meios de bancada, meios de maturação, meios de fecundação, gradiente de Percoll 90, synthetic ovidutal fluid (SOF), foram produzidos no laboratório de reprodução animal do CTZL, com produtos químicos adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA).

## **4.3 Produção de Embriões *In Vitro***

### **4.3.1 Recuperação das estruturas**

Os animais foram mantidos em troncos de contenção para bovino. Inicialmente, para realização dos procedimentos, foi feita a assepsia do local com álcool 70° seguida de anestesia epidural baixa com Lidocaína 2% (3-5mL) (Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). Após realizada a limpeza da região perineal com água e sabão neutro, seguida de assepsia com álcool 70°, a guia de aspiração foi posicionada no fórnix vaginal,

lateralmente a cérvix, sendo direcionada para o mesmo lado do ovário a ser aspirado. Os ovócitos foram aspirados em PBS (Phosphate buffered saline) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (Sigma®) e 2µl/mL de Heparina Sódica (Heptar® i.v. Eurofarma, Brasil), a temperatura de 36°C. A pressão de aspiração utilizada foi de 10 a 15mL/min. Os ovócitos recuperados foram levados imediatamente ao laboratório para os processos filtragem, seleção e maturação.

Para OPU foram utilizados aparelho de ultrassom modelo HS 1500 (Honda®, Japão), acoplado a uma probe setorial micro-convexa HCV-3710 MV (Honda®, Japão), multi-frequencial de 5, 7,5 e 10mHz, montada em uma guia transvaginal (WTA®, Brasil), uma bomba de vácuo digital BV-003d (WTA®, Brasil), acoplado a um sistema com uma agulha 18G (WTA®, Brasil).

#### 4.3.2 Seleção e classificação dos ovócitos

Os ovócitos aspirados foram mantidos em tubos de 50 mL em banho Maria a 35°C até a lavagem do conteúdo aspirado. Em seguida o conteúdo do tubo foi revertido em um filtro de coleta de embriões com malha de 50µm e lavado com solução de PBS aquecido com auxílio de seringa de 20 ml e agulha 40x12. Após a lavagem, a solução com os ovócitos foi depositada em uma placa de 100x20 mm contendo meio de bancada (TCM 199 sais de Hank`s - Gibco BRL®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRL®), penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Os Complexos *Cumulus Oophorus* (CCOs) foram procurados com auxílio de um esteriomicroscópio SMZ 645 (Nikon®, Japão). Apenas os CCOs de qualidade I, II e III foram utilizados para MIV, classificados como preconizados por LEIBFRIED & FIRST (1979), de acordo com uma escala de I a IV, considerando as características do *cumulus* e do citoplasma do ovócito:

Qualidade I: *Cumulus* compacto e presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade II: *Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o mesmo, com menos de três camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha



escura. O ooplasma preencha todo o espaço interior da zona pelúcida. Qualidade III: *Cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida. Preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado. Qualidade IV: Oócito desnudo sem células *cumulus*.

#### **4.3.3 Maturação *in vitro* dos ovócitos (MIV)**

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para uma placa contendo GOTAS DE 200µL de meio de maturação coberto com óleo Mineral (Sigma®) e incubados por 22 horas a 39 °C à 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação foi composto por TCM 199 sais de Earles (Gibco BRL ®) suplementado com 10 % de SFB (Gibco BRL®), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH Sigma ®), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH Sigma®), 1 µg/mL L-glutamina (Sigma®), 100 UI/ml penicilina (Sigma®) e 50 µg/mL estreptomicina (Sigma®).

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

Para a FIV, os ovócitos foram separados em grupos de até 30 estruturas, lavados e transferidos para gotas de 150 µL de meio de fecundação. O meio de fecundação utilizado foi o TALP, suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma®), 1 mM de hipotaurina (Sigma®), 250 mM de epinefrina (Sigma®) e 10 µg/ml de heparina (Sigma®). Foram utilizados para fecundação apenas os ovócitos recuperados de grau 1, 2 e 3.

Para os experimentos foram utilizadas doses de sêmen do mesmo reprodutor da raça Sindi e da mesma partida, avaliados previamente, estando de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução. A seleção espermática foi realizada pelo método do gradiente mini percoll consistindo de 0,5 mL de percoll 45 e 0,5 mL de percoll 90 % (Parrish *et al.*, 1995). O sêmen descongelado em banho maria à 36°C, foi depositado sobre o gradiente de percoll previamente preparado, e centrifugado à 700g por 20 minutos à 30°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado permanecendo apenas o *pellet*, que foi

ressuspendido com 2 ml de TALP-sp e centrifugado à 700g por 5 minutos, sendo então ressuspendido com meio de fecundação. Após a avaliação da concentração do sêmen,  $1 \times 10^6$  espermatozoides / ml foi adicionado à gota de fecundação de 150 $\mu$ L.

Os ovócitos e espermatozoides foram co-incubados por 22 horas em estufa a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, sendo o dia da fecundação considerado D0. Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados em meio de cultivo (SOFaaci) e distribuídos nas gotas de cultivo na quantidade de até 30 estruturas /gota.

#### **4.3.5 Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)**

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio fluído sintético do oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato* (Sigma®), 2,77 mM myo-inositol (Sigma ®) e 5 % de SFB (SOFaa) (Holm *et al.*, 1999). As placas de cultivo foram preparadas um dia antes da sua utilização, sendo que o tamanho da gota de cultivo foi de 150 $\mu$ l.

Os embriões foram avaliados 44 horas após a inseminação para determinar a taxa de clivagem e em D7 (sete dias após a inseminação) para avaliação taxa de blastocisto.

Por se tratar de animais registrados e como os embriões produzidos seriam utilizados para transferência em receptoras, as estruturas de cada animal eram aspiradas, maturadas, fecundadas e cultivadas separadamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 721 CCOs foi recuperado das 14 vacas, no período de cinco semanas, dos quais, 411 foram classificados como sendo de grau I, II e III de acordo com LEIBFRIED & FIRST (1979), e foram utilizados para produção de embriões *in vitro*.

Não houve diferença significativa entre os grupos para as médias dos folículos aspirados <3,0mm. Estes se mantiveram entre 4 e 9% do total dos folículos aspirados para cada grupo (P<0,05). Para folículos >8mm também não houve diferença significativa entre os grupos, apresentando médias para cada grupo de 1,2 (28%), 1,38 (26%) e 1,5 (31%) (P<0,05).

Conforme esperado, neste trabalho houve também um maior número de folículos entre 3-8mm para os grupos que receberam FSH, sendo o melhor resultado obtido pelo grupo RFD-FSH(s) em relação ao grupo sem estimulação RFD-OPU, 7,8 (68%), 8,57 (68%), 5,2 (60%), respectivamente (P<0,05), (tabela 2.1).

Estes resultados podem ser explicados por diversos fatores. A sincronização da onda a partir da remoção do folículo dominante faz com que os níveis de inibina e estrógeno sejam diminuídos e assim poça haver um novo recrutamento. Aqueles folículos subordinados que estavam entrando em processo de apoptose retomam seu crescimento em um curto intervalo de tempo.

Da mesma maneira o aporte de FSH exógeno faz com que ao invés de termos apenas um folículo dominante crescendo e entrando em divergência, tenhamos vários folículos crescendo ao mesmo tempo, o que faz com que tenhamos uma maior população de folículos entre 3-8mm para os grupos que receberam FSH. Estes por sua vez, aumentam de diâmetro e fazem com que as concentrações de inibina e estrógeno volte a crescer, promovendo a atresia dos folículos que iram formar uma nova onda, fazendo com que o número de pequenos folículos seja bastante reduzido.

A presença de um implante intravaginal de progesterona durante os tratamentos faz com que os níveis de progesterona permaneçam altos prevenindo assim uma possível ovulação e cria um ambiente propício ao desenvolvimento folicular.

Resultados semelhantes foram obtidos por De Roover et al. (2005), Ramos et al., (2006), Chaubal et al. (2007), Diesel (2010) e Nivet et al. (2012) em raças taurinas e zebuínas.

Tabela 2.1 – Distribuição média do número de folículos aspirados de vacas Sindi (*Bos indicus*) estimuladas com FSH em diferentes protocolos, de acordo com o tamanho dos folículos, com respectivos erros padrão da média (n=721)

Tratamentos	Tamanho dos Folículos		
	<3mm	3-8mm	>8mm
T1	0,52±0,17	7,80±0,80 <sup>a</sup>	1,20±0,23
T2	0,76±0,24	8,57±1,04 <sup>a</sup>	1,38±0,24
TC	0,80±0,33	5,20±0,51 <sup>b</sup>	1,50±0,19

<sup>a,b</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

T1: Grupo RFD+FSH(m); T2: Grupo RFD+FSH(s); TC: Grupo RFD-OPU.

A média dos folículos aspirados por animal por sessão, para cada tratamento foi de 11,36±1,39, 12,52±1,81 e de 8,7±0,74 respectivamente (P<0,05), (Tabela 2.2). O grupo T2 [DFR-FHS(s)] foi semelhante a T1 [DFR+FSH(s)] e superior ao grupo TC (DFR-OPU), para a média dos folículos aspirados (P<0,05). Houve semelhança entre os grupos T1 e TC para essa característica (P<0,05).

Os resultados mostram uma maior capacidade dos protocolos com FSH (T1 e T2) de promover o desenvolvimento dos folículos presentes em cada doadora e com isso obter um maior número de folículos com diâmetro ideal para OPU, lembrando que estes protocolos não são capazes de aumentar o número de folículos por doadora, apenas aumentar a disponibilidade dos folículos presentes. O número de folículos aspirados é uma característica inerente à doadora, e é afetado pelo pool de folículos antrais presentes no ovário, com animais

apresentando, baixa, média ou alta contagem de folículos, mantendo uma repetibilidade entre as sessões (Silva-Santos et al., 2013).

Tabela 2.2 – Respostas por animal (média±erro padrão) em vacas Sindi (*Bos indicus*), sob regime de aspiração semanal, estimuladas com FSH em diferentes protocolos.

Tratamentos	Fol Asp	CCOs Rec	Ovo Mat	Clivagem	Blastocistos
T1	11,36±1,39 <sup>ab</sup>	9,76±1,32 <sup>a</sup>	6,72±1,04 <sup>ab</sup>	4,76±0,58	2,20±0,44
T2	12,52±1,81 <sup>a</sup>	9,81±1,83 <sup>a</sup>	7,33±1,32 <sup>a</sup>	5,52±1,43	2,71±0,64
TC	8,70±0,74 <sup>b</sup>	6,30±0,82 <sup>b</sup>	4,45±0,51 <sup>b</sup>	3,75±0,51	1,60±0,29

<sup>a,b</sup>Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística

( $P < 0,05$ ).

T1: Grupo RFD+FSH(m); T2: Grupo RFD+FSH(s); TC: Grupo RFD-OPU.

O número médio de ovócitos recuperados foi maior para os grupos que receberam FSH em relação ao grupo TC, sendo de 9,76±1,32, 9,81±1,83 e 6,3±0,82 ovócitos respectivamente para T1, T2 e TC (Tabela 2.2). A quantidade superior de CCOs recuperados foi correspondente ao maior número médio de folículos disponíveis e aspirados nos grupos que receberam FSH.

Para as taxas de recuperação dos CCOs houve diferença estatística entre os grupos, sendo o grupo T1 superior aos demais (87%, 74% e 69% para T1, T2 e TC respectivamente) (Tabela 2.3). Estes resultados também refletem o efeito positivo da estimulação com FSH em dose múltipla. Além disso, é possível observar que as altas taxas de recuperação de ovócitos em todos os grupos está associada à habilidade do técnico que realizou o procedimento.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Chaubal et al. (2006; 2007) e por Diesel (2010), que também observaram um maior número de ovócitos recuperados para os grupos com estimulação ovariana, trabalhando com *Bos taurus* e *Bos indicus* respectivamente. No entanto, Nivet et al. (2012), trabalhando com vacas holandesas lactantes, estimuladas com FSH por três dias consecutivos, com seis doses de 40mg de Folltropin a cada dose horas, em diferentes tempos de *coasting* (20, 44, 68 e 92horas), não observaram diferença significativa sobre as taxas de recuperação de ovócitos entre os grupos tratados ou não.

Nonato Jr. et al. (2006) trabalhando com vacas nelore, com ablação folicular em D3 (em relação a colocação do implante (D0)), tratados com 50mg de Folltropin, com 36 horas de restrição obtiveram taxas de recuperação melhor para o grupo controle em relação ao grupo tratado. Da mesma forma Ribeiro et al. (2011), trabalhando com fêmeas mestiças nelore, estimuladas com FSH ou eCG também não encontraram diferenças significativas para essa característica.

Para o número de ovócitos com qualidade para maturação, o grupo T1 foi superior em relação ao grupo TC, porém não houve diferença significativa entre os grupos tratados com FSH (T1 e T2), ( $P < 0,5$ ). Houve semelhança entre os grupos T1 e TC, sendo as médias de ovócitos maturados de  $6,72 \pm 1,04$ ,  $7,33 \pm 1,32$  e  $4,45 \pm 0,51$  respectivamente (Tabela 2.2).

Esses números traduzem um maior número de estruturas disponíveis para maturação nos grupos T1 e T2 em relação a TC, em função do maior número de estruturas recuperadas, pois não houve diferença entre as porcentagens de estruturas viáveis para maturação entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Uma vez que as estruturas utilizadas para maturação foram apenas as de qualidade I, II e III, e que a porcentagem dessas estruturas entre os grupos foi semelhante, permite dizer que a qualidade ovocitária entre os grupos foi semelhante, apesar da diferença numérica entre as estruturas maturadas.

Diesel (2010) trabalhando com fêmeas nelore estimuladas com FSH (162UI de PLUSET), em seis doses decrescentes de 12-12 horas, ou FSH+LH (25mg, seis horas antes da OPU), com 36 horas de restrição da estimulação antes da OPU, também não observou melhora na qualidade dos ovócitos recuperados para os grupos tratados. Este mesmo resultado foi observado por Ribeiro et al. (2011).

Estes resultados divergem dos apresentados por Chaubal et al. (2006), De Roover et al. (2005), Aller et al. (2010), que observaram um aumento da qualidade dos ovócitos obtidos a partir da estimulação ovariana com o uso de FSH, associado ou não a remoção do folículo dominante. Tal observação pode estar ligada a ineficiência dos protocolos utilizados em promoverem o aumento da qualidade das estruturas recuperadas, mas também podem refletir diferenças na classificação das estruturas, realizada de forma subjetiva, o que nos mostra a importância de uma revisão dos parâmetros morfológicos utilizados para classificação.

Tabela 2.3 – Taxas de recuperação de ovócitos, clivagem e de blastocisto em vacas Sindi, sob regime de aspiração semanal após estimulação com FSH (Folltropin®-V) em doses simples ou múltiplas, seguido por diferentes períodos de restrição (coasting).

Tratamento	Taxa de Recuperação	Taxa de Clivagem	Taxa de Blastocisto (D7)
T1	85,0 (244/280) <sup>a</sup>	82,0 (138/168)	33,0 (55/168)
T2	78,0 (206/263) <sup>b</sup>	78,0 (121/154)	35,0 (54/154)
TC	72,0 (126/174) <sup>b</sup>	84,0 (75/89)	35,0 (32/89)

<sup>a,b</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

T1: Grupo RFD+FSH(m); T2: Grupo RFD+FSH(s); TC: Grupo RFD-OPU; D7: sétimo dia de cultivo dos embriões.

Embora o número de folículos aspirados e o número de folículos recuperados tenham sido superiores para os grupos que receberam FSH, não houve diferença significativa entre os grupos entre as médias de estruturas clivadas, bem como para as médias de embriões por tratamento, considerando  $P < 0,05$ . As taxas de clivagem para os grupos T1, T2 e T3 foram respectivamente de 82% (138/168), 78% (121/154) e 84% (75/89) para cada grupo e as taxas de produção de blastocistos foram de 33% (55/168), 35% (54/154) e 35% (32/89) para T1, T2 e TC respectivamente (Tabela 2.3). Estes resultados não apresentaram diferença significativa entre si ( $P < 0,05$ ).

Estes dados discordam daqueles obtidos por diversos autores, que trabalharam com a estimulação hormonal em *Bos taurus*, como Blondin et al. (2002), Chaubal et al. (2006), Nonato Jr et al. (2005), Chaubal et al. (2007) e Nivet et al. (2012) e observaram melhoras significativas dessas taxas. Essa melhora é associada à aquisição da competência de ovócitos obtidos de folículos maiores pós estimulação. O momento pós-hormonal em que a OPU é realizada pode ter influência sobre a aquisição da competência desses ovócitos, pois quando doadoras são tratadas com FSH, existe um rápido crescimento folicular, que pode ter um efeito negativo sobre a aquisição da competência desses ovócitos (Blondin et al., 1996).

Possivelmente, nesse estudo, a associação entre a sincronização da onda com o uso dos implantes de progesterona, a retirada do bloqueio exercido pela dominância folicular, a partir da realização da remoção do folículo dominante no início dos tratamentos e as doses

de FSH utilizadas, foram eficientes em promover o crescimento de um maior número de folículos. Porém, essa estimulação hormonal não foi capaz de promover uma eficiente maturação ovocitária e aquisição da competência. Esse maior número de estruturas disponíveis não foi capaz de promover melhoras nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Ribeiro et al (2011), trabalhando com vacas mestiças Nelore, com 120UI de FSH (PLUSET), em quatro aplicações a cada 12 horas seguida de OPU, ou 1400UI de eCG seguida de OPU, não observaram diferença significativas para qualidade de ovócito, taxa de clivagem e taxa de blastocisto entre os grupos tratados e o grupo controle.

Monteiro et al. (2009) utilizando três protocolos, grupo controle, FSH seguida de 12hs de privação e OPU (LH 6hs antes da OPU), ou FSH+ 48hs de privação+LH6hs antes da OPU e não observaram diferenças significativas para taxa de clivagem e taxa de blastocisto entre os grupos, resultados estes também confirmados por Reis et al. (2010).

Blodin et al., (2002) demonstraram que a estimulação do crescimento folicular faz com que o ovócito contido no mesmo aumente de tamanho. Esse aumento de tamanho é responsável por enviar sinais de maturação a este ovócito. No entanto, os períodos para que ocorram à maturação folicular e maturação ovocitária são diferentes e tais fenômenos podem ocorrer desacoplados (Blondin et al., 1996; Goodhand et al., 2000). Consequentemente, os folículos podem ter seu desenvolvimento estimulado, a maturação desses ovócitos grandes pode ser afetada, resultando em uma grande população de CCOs disponíveis, porém com ovócitos não competentes, incapazes de se desenvolverem até o estágio de blastocisto (Blondin et al., 2002).

Até agora o número de embriões obtidos tem sido relativamente baixo por meio de aspiração transvaginal em animais estimulados (Walsh et al., 2011). As razões para isso não estão bem esclarecidas na literatura, mas pode ser explicado pelas baixas taxas de fertilização de ovócitos pré-maturados in vivo e as dificuldades de se trabalhar com animais muito próximos ao momento da ovulação (Nivet et al., 2012).

Os protocolos são diretamente influenciados pela doses de hormônio utilizadas, estágio da onda folicular onde se inicia a estimulação, raça e estoques de folículos antrais da doadora, duração do tempo de privação ou coasting até o momento da OPU. Estes parâmetros em *Bos taurus* parecem estar bem estabelecidos, mas em *Bos indicus* ainda são necessários maiores ajustes para se desfrutar das vantagens oferecidas pela técnica.



## **6 CONCLUSÃO**

Neste trabalho, os protocolos utilizados foram eficientes em promover o desenvolvimento folicular e com isso aumentar o número de folículos disponíveis para OPU/PIVE, porém não houve melhora nas taxas de clivagem e de blastocisto.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; RIOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.119, p 1-8, 2010.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S; GIMENES, L.U.; SA´ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A.; BO,´ G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1583-1593, 2011.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.;TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, n.66, p.38-43, 2002.
- BLONDIN, P.; GUILBAULT, L.A.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.46, p.1191–1203, 1996.
- CAIXETA, S.C.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v.17, p.8-18, 2010.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal trataments for increasing the oocyte and embryo production in na OPU-IVP system. **Theriogenology**, v.67, p.719-728, 2007.
- CHAUBAL, S.A; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; FERRE, L.B.; FABER, D.C.; BOLS P.E.J.; RIESEN, J.W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v.65, p.1631-1648, 2006.
- DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, C.H. Efects of Ovum Pick-Up frequency and FSH stimulation:A retrospective study on seven yers of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.239-245, 2008.
- DISEL, T.O. Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidade de ovócitos, obtidos por aspiração transvaginal em novilhas nelore. Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, **Dissertação de Mestrado**, p.81, 2010.

- GOODHAND, K.L.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. In vivo recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, estradiol and FSH. **Animal Reproductin Science**, v.63, p.145–158, 2000.
- HOLM. P.; BHOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Hight bovine blastocyst development in a statistic in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or whitout serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. 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.
- LEITE, P.R.M.; SANTIAGO, A.A.; NAVARRO FILHO, H.R.. Sindi: gado vermelho para o semi-árido. **Ed. EMEPA – PB / Banco do Nordeste**, Joao Pessoa, 147p,2001.
- MARIZ, A.T.M. Caracterização zoométrica, estrutura populacional e índices reprodutivos da raça Sindi no Brsil. Areias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, **Tese de Doutorado**, p.102, 2010.
- MONTEIRO, F.M.; FERREIRA, M.M.G.; POTIENS, J.R.; EBERHARDT, B.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of superovulatory protocols on in vitro production of Nellore (*Bos indicus*) embryos. **Reproduction Domestic Animals**, v.4, p.1–5, 2009.
- NIVET, A.; BUNEL, A.; LABRECQUE. R.; BELENGER, J.; VIGNEAUL, C. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model, **Reproduction Research**, v.143, p.165-171, 2012.
- NONATO JÚNIOR, I.; PONTES, J.H.F.; ERENO JÚNIOR, J.C.; SANCHES, B.V.; SENEDA, M.M. Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com FSH previamente à aspiração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Suplemento), p.369, 2005 (Abstract).
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Efect of bovine sperm separation by either Swim-up or Percol method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.
- RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ FILHO, W.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção in vitro de embriões ma raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.341-347, 2006.
- 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 of the follicular wave emergence on OPU-IVP of Nelore (*Bos indicus*) and Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **Acta Scienci Veterinary**, v-38, p.385, 2010.

- RIBEIRO, L.V.P; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B.; SEKO, M.B.; MARTINEZ, A.C.; RIBEIRO, M.G.; MARTINS, R.R.; ÁVILA, M.R.; DE CONTI, J.B. Recuperação de ovócitos e produção in vitro de embriões de vacas estimuladas com FSH e eCG. **Arquivos de Zootecnia**, v.60, n.232, p. 1021-1029, 2011.
- SILVA-SANTOS, K.C; MARINHO, L.S.R; SANTOS, G.M.G;MACHADO, F.Z.; GONZALES, S.M; LISBOA, L.A;SENEDA, M.M. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.180-186, 2013.
- SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.; WARE, C.B. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v-39, p.546–552, 1988.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v.65, p.126-36,2006.
- STROUD B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. **IETS Newlest**, v.50, p.16-25, 2012.
- TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; MARTINEZ, M.L. Raça Sindi : uma opção na produção de leite para o semi-árido brasileiro -**Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora-MG (edição online) out. 2002. Disponível em: <<http://www.cnpql.embrapa.br/nova/informacoes/melhoramento/Sindi/sindi.php>>. Acesso em 8 de fevereiro. 2014.
- WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.127–138, 2011.