

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Programa dos Cursos de Pós-Graduação

EFEITO DE PROGESTESTERONA E BENZOATO DE ESTRADIOL  
NA DINÂMICA FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2006

Alexandre Floriani Ramos

EFEITO DE PROGESTERONA E BENZOATO DE ESTRADIOL  
NA DINÂMICA FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.  
Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2006







*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais Ligia e Caio, irmãs Gabriela e Flávia, avós Sussa, Léa, Zé e Neti (in memoriam) e namorada Katlen, que além de me abrirem as portas, mostram-me os caminhos os quais percorro todos os dias de minha vida.*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Antônio de Pinho Marques Jr, pela orientação, ensinamentos e formação acadêmica me concedida durante esta caminhada.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf, pela oportunidade, confiança e co-orientação.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, co-orientador, pela dedicação, apoio e serenidade a mim dispensado durante o curso de doutorado.

Ao Dr. Roberto Sartori Filho, pela apoio e dedicação em todos os momentos em que foi solicitado.

Ao Dr. Ivo Pivato, pela amizade e companheirismo a mim dedicados e pela capacitação técnica em aspiração folicular e outras biotécnicas da reprodução.

Ao José Urias Câmara e Marcos Rollemberg Mollo, pelo colaboração direta na execução dos experimentos.

Aos demais colegas e funcionários da Embrapa-Cenargen, que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

A todos os estagiários que, em diferentes momentos, colaboraram na realização dos experimentos.

À Embrapa/Cenargen, pelo apoio financeiro e por propiciar as condições necessárias para a implementação e condução do experimento.

À Escola de Veterinária da UFMG, que me acolheu durante a realização do curso de doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

1 - Introdução.....	13
1.1 - Hipóteses.....	13
1.2 - Objetivos.....	13
2 - Literatura consultada.....	14
2.1 - Hormônios e seus efeitos sobre a foliculogênese.....	14
2.1.1 - Progesterona.....	14
2.1.2 - Estradiol.....	14
2.1.3 - Hormônio Folículo Estimulante.....	14
2.1.4 - Hormônio Luteinizante.....	14
2.1.5 - Inibina.....	15
2.2 - Dinâmica Folicular.....	15
2.3 - Sincronização da onda folicular.....	15
2.4 - Capacidade do ovócito em produzir embriões in vitro.....	16
2.5 - Protocolos de aspiração folicular para produção de embriões in vitro.....	17
3 - Material e métodos.....	18
3.1 - Local.....	18
3.2 - Animais e tratamentos.....	18
3.2.1 - Experimento 1.....	18
3.2.2 - Experimento 2.....	19
3.2.3 - Experimento 3.....	20
3.3 - Aspiração folicular.....	21
3.4 - Avaliação do ovócito e produção in vitro de embriões (PIVE).....	21
3.5 - Ultra-sonografia ovariana e das características da onda folicular.....	22
3.6 - Coleta de sangue e análise hormonal.....	22
3.7 - Análise estatística.....	22
4 - Resultados e discussão.....	23
4.1 - Dinâmica folicular.....	23
4.2 - Aspiração folicular e produção in vitro de embriões.....	29
5 - Conclusão.....	33
6 - Referências bibliográficas.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	25
Tabela 2 – Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE).....	27
Tabela 3 - Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular, em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE).....	28
Tabela 4 – Média±DP do número de folículos aspirados, ovócitos recuperados, ovócitos clivados e blastocistos produzidos, por novilha, por sessão de aspiração, em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	30
Tabela 5 - Média±DP de folículos aspirados, ovócitos recuperados, ovócitos clivados e blastocistos produzidos, por novilha, por sessão de aspiração, em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias, tratadas com progesterona e benzoato de estradiol 0h, 12h e 24h antes da aspiração folicular.	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 1.....	19
Figura 2 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 2.....	20
Figura 3 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 3.....	21
Figura 4 – Média e DP do diâmetro do maior folículo, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	23
Figura 5 – Média e DP da concentração sérica de FSH, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	24
Figura 6 – Média e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	25
Figura 7 – Média e DP do diâmetro do maior folículo, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE).....	26

Figura 8 – Média e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE).....	27
Figura 9 – Média e DP do diâmetro do maior folículo, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE). (P>0,05).....	28
Figura 10 – Média e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE). (P>0,05).....	29
Figura 11– Taxa de clivagem e de blastocisto em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).....	31
Figura 12 – Taxa de clivagem e de blastocisto em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE).....	32

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de benzoato de estradiol (BE) e progesterona/norgestomet sobre a dinâmica folicular de novilhas aspiradas a cada sete dias, sincronizando a emergência da onda folicular para aumentar o número de folículos e qualidade dos ovócitos. Em três experimentos, novilhas meio sangue Simental x Nelore foram divididas aleatoriamente em três tratamentos, com todos os animais participando de todos os tratamentos. Nos experimentos 1 e 2, as novilhas foram sincronizadas com implante de progesterona/progestágeno por 7 d seguido da administração im de 150 µg de d-Cloprostenol e aspiração de todos os folículos maiores que 3 mm de diâmetro. No Experimento 1 (n=12), os folículos das novilhas do tratamento 2X foram aspirados duas vezes por semana, com intervalo de 3 e 4 d, e os das novilhas do tratamento 1X e 1X-BE uma vez por semana. As novilhas do tratamento 1X-BE receberam 2 mg de BE im após a aspiração. No Experimento 2 (n = 12), as novilhas do tratamento NBE não receberam BE, e as dos tratamentos 2BE e 5BE receberam 2 mg e 5 mg após a aspiração. No Experimento 3 (n = 15), as novilhas foram sincronizadas com 2 mg de BE e implante intravaginal de progesterona (DIB) por sete dias, seguido de administração de PGF2 $\alpha$ . No dia quatro do ciclo estral subsequente, as novilhas receberam DIB e tiveram todos os folículos maiores que 3 mm de diâmetro aspirados, seguido da administração de PGF2 $\alpha$  no dia sete. As novilhas do tratamento 0h-BE (n= 4), -12h-BE (n = 6) e -24h-BE (n = 5) receberam 2 mg de BE imediatamente após a aspiração, doze e vinte e quatro horas antes, respectivamente. O sêmen, meios utilizados e as condições de cultivo foram iguais para todos os tratamentos. O número de folículos maior que 3 mm e o tamanho do maior folículo foram avaliados por ultra-sonografia no momento da aspiração folicular. Todos os ovócitos aspirados foram maturados e fecundados *in vitro* (D0), com a taxa de clivagem e a taxa de blastocisto avaliadas no D2 e D7, respectivamente. Durante uma semana foi realizada, diariamente, a mensuração do tamanho do maior folículo, por ultra-sonografia, e coletado sangue para a quantificação da concentração de FSH. Embora o uso de 2 mg de BE associado a progestágeno/progesterona tenha alterado o padrão de crescimento folicular e a concentração de FSH, não foi capaz de sincronizar eficientemente a emergência da onda e o desvio folicular, além de não aumentar o número e a qualidade dos ovócitos recuperados. Este estudo falhou em mostrar o efeito positivo da aspiração folicular logo após a emergência da onda folicular, quando o efeito da dominância seria menos evidente, sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. Além disso, o uso de BE associado a um dispositivo de progesterona, 12 h ou 24 h antes da aspiração folicular, prejudicou a produção de embriões *in vitro*, em um programa de aspiração com intervalo de sete dias entre sessões.

Palavras-chave: aspiração folicular; benzoato de estradiol; produção *in vitro* de embriões; progestágeno; sincronização folicular.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of estradiol benzoate (EB) and progesterone/norgestomet on follicular dynamics of heifers aspirated every 7 d through synchronization of the follicular wave emergence in order to increase the number of follicles and quality of the recovered oocytes. Three experiments were designed in which crossbred Simmental x Nelore heifers were randomly divided into three groups, with all animals participating in all groups. In experiments 1 and 2, heifers were synchronized using a progestin implant for 7 d followed by a 150 µg im injection of d-Cloprostenol and aspiration of all ovarian follicles greater than 3 mm in diameter. In experiment 1 (n = 12), follicles from group 2X were aspirated twice a week with 4- and 3-day interval, and follicles from 1X and 1X-EB heifers were aspirated once a week. Heifers from group 1X-EB also received an im injection of 2 mg of EB immediately after OPU. In experiment 2 (n= 12), all heifers were aspirated once a week. Heifers from 0EB group did not receive EB, and from 2EB and 5EB received 2 mg and 5 mg of EB immediately after OPU. In experiment 3 (n = 15), heifers were synchronized with 2 mg EB and progesterone intravaginal implant (DIB) for seven d followed by an im PGF2α injection. On day 4 of the subsequent estrous cycle, heifers received a DIB and had all ovarian follicles larger than 3 mm in diameter aspirated, followed by a PGF2α injection on day seven. Heifers in groups 0h-EB (n = 4), -12h-EB (n = 6) and -24h-EB (n = 5) received 2 mg of EB immediately after OPU and twelve and twenty four h before, respectively. The semen, media used and culture conditions were equal for all groups. Ultrasound evaluations of number of follicles greater than 3 mm in diameter and size of the largest follicle at the time of OPU were performed. All recovered oocytes were *in vitro* matured and fertilized (D0). Cleavage rate on D2 and blastocyst production on D7 was evaluated. During a 7-day period, daily measurement of the size of the greatest follicle was performed by ultrasonography, and daily blood collection was done for evaluation of serum FSH concentrations. Although the use of EB in association with a norgestomet/progesterone implant seven d prior to OPU have altered follicular wave profile and FSH concentration, it was not able to efficiently synchronize the emergence of follicular wave and follicular deviation. Moreover, it was not enough to improve number and quality of the recovered oocytes. This study failed to demonstrate a positive effect of OPU earlier after wave emergence, when the effect of dominance should be less pronounced, on IVP in bovine. Moreover, the use of EB in association with a progesterone implant 12 and 24 h prior to OPU compromised the *in vitro* embryo production in a program of OPU with a 7 d interval between sessions.

Key-words: estradiol benzoate; follicular synchronization; *in vitro* embryo production; ovum pick-up; progestagen.

# 1 INTRODUÇÃO

A técnica de aspiração folicular, seguida de fecundação *in vitro*, surgiu no fim da década de 80, tornando-se operacional e de aplicação comercial na década seguinte. Ela tem como vantagem sobre a coleta de embriões tradicional, a possibilidade de produção de um número superior de embriões, uma vez que pode ser realizada com maior frequência tanto em novilhas como em vacas gestantes e lactantes.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos é preconizada como ferramenta para maximizar a utilização de doadoras de alto mérito genético, aumentando o ganho genético anual para aproximadamente 2,5% (Vishwanath, 2003). Algumas aplicações da PIVE incluem a produção de grande número de embriões para transferência comercial, auxílio à reprodução de doadoras de alto valor com infertilidade adquirida, produção de embriões de animais jovens, reduzindo o intervalo entre gerações, recuperação genética e produção de animais clones e transgênicos (Galli et al., 2003).

Apesar dos vários estudos nesta área, o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos até o estágio de blastocisto raramente supera a taxa de 40%. Parte destes resultados têm sido atribuídas às condições de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Entretanto, estes resultados podem estar associados à capacidade dos ovócitos aspirados de folículos pequenos em se desenvolverem *in vitro*. Fatores extrínsecos (Bols et al., 1996; 1997; Hashimoto et al., 1999) e intrínsecos ao ovócito (Sirard e Blondin, 1996; Bevers et al., 1997; Rizo et al., 2002) podem interferir na capacidade deste em fecundar e desenvolver-se até blastocisto. Dentre os fatores intrínsecos está a presença do folículo dominante que, principalmente através da secreção de estradiol e inibina, exerce efeito inibitório sobre o desenvolvimento de outros folículos (Wolfsdorf et al., 1997).

Com o objetivo de aumentar os índices de produção, diferentes protocolos de aspiração folicular têm sido descritos na literatura, com aspirações realizadas em diferentes dias do ciclo estral (Pieterse et al., 1991), com diferentes intervalos entre aspirações (Simon et al., 1993;

Gibbons et al., 1994; Galli et al., 2001) e com o uso de gonadotrofinas (Goodhand et al., 1999; Pivato, 2001).

O uso de estradiol em associação com progesterona para sincronizar a onda folicular é baseado em seu efeito inibitório sobre o desenvolvimento folicular (Bó et al., 2002) e sobre sua capacidade de induzir atresia folicular através da inibição da liberação de FSH (Bó et al., 1995; Caccia e Bó, 1998; Sartori et al., 2003).

## 1.1 Hipóteses

O uso de progesterona e benzoato de estradiol sincroniza a onda folicular em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias;

A sincronização da onda folicular aumenta o número de folículos aspirados e ovócitos recuperados, bem como a produção de embriões;

A sincronização da onda folicular aumenta a taxa de blastocistos.

## 1.2 Objetivos

Alcançar o momento ideal para a aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias;

Investigar o efeito da administração de progestágenos e benzoato de estradiol sobre a sincronização da emergência da onda folicular em novilhas submetidas à aspiração folicular;

Avaliar a utilização de protocolos hormonais à base de progesterona e benzoato de estradiol para aumentar a recuperação e a qualidade de ovócitos bovinos oriundos de animais vivos.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 *Hormônios e seus efeitos sobre a foliculogênese*

#### 2.1.1 Progesterona

A progesterona é um hormônio esteróide produzido principalmente pelo corpo lúteo. A progesterona produzida pela placenta é liberada na circulação materna e está relacionada a várias funções durante a gestação, tais como a manutenção estrutural e funcional do útero, proporcionando um ambiente uterino favorável ao desenvolvimento embrionário, e crescimento e desenvolvimento da glândula mamária (Hadley, 1996). A progesterona luteal está também envolvida no processo de regulação do desenvolvimento folicular, podendo causar atresia, quando associada ao estradiol, pela inibição da secreção de gonadotrofinas (Burke et al., 1999). Pfeifer et al. (2005) mostram que o uso de progesterona aumenta o número de folículos aspirados e ovócitos recuperados, bem como taxa de produção embrionária, sugerindo que a progesterona pode desempenhar função importante no desenvolvimento folicular e maturação final do ovócito

#### 2.1.2 Estradiol

O estradiol, hormônio esteróide produzido pelas células da granulosa de folículos em desenvolvimento, entre outras ações, atua sozinho ou em sinergismo com a inibina, quando na presença de progesterona, na supressão da concentração circulante de hormônio foliculo estimulante (FSH) (Ginther et al., 2003). Associado a progesterona, tem a capacidade de induzir atresia folicular e sincronizar a emergência de uma nova onda folicular, com potencial de fertilidade dentro da normalidade (Bó et al., 1995). Além disso, a administração de estrógeno, na ausência de progesterona, pode induzir o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) (Lammoglia et al., 1998) e exercer atividade

luteolítica durante a fase luteal (Salfen et al., 1999).

#### 2.1.3 Hormônio Foliculo Estimulante

O hormônio foliculo estimulante, gonadotrofina secretada pela hipófise anterior, é constituído de duas subunidades formadas por 210 aminoácidos e, semelhante ao LH, tem sua secreção controlada pelo hipotálamo, através da liberação de GnRH. Durante a foliculogênese o FSH, responsável pelo recrutamento folicular, apresenta aumento de sua concentração um dia antes da emergência da onda folicular (Adams et al. 1992; Ginther et al., 1996). Durante a fase de seleção folicular, a concentração de FSH diminui em resposta ao *feedback* negativo exercido pelo estradiol e inibina produzidos por um tratamento de folículos em crescimento e, em seguida, pelo foliculo dominante, ocasionando atresia dos folículos subordinados (Ginther, 2000). A ação do FSH envolve o contínuo crescimento dos folículos antes do desvio folicular e posterior desenvolvimento do foliculo dominante. Baseado em estudos *in vitro*, o FSH estimula a produção de estradiol, IGF-I, ativina e inibina, além de fatores intrafoliculares envolvidos no processo de seleção do foliculo dominante (Ginther et al., 2003).

#### 2.1.4 Hormônio Luteinizante

O hormônio luteinizante, gonadotrofina secretada pela hipófise anterior, é constituído de duas subunidades formadas por 204 aminoácidos. Na foliculogênese, está envolvido no mecanismo de desvio folicular, através da expressão de receptores de LH pelas células da granulosa do futuro foliculo dominante, podendo este seguir seu desenvolvimento sob o estímulo do LH, mesmo com a redução da concentração de FSH (Ginther et al., 2003). Dentre as ações do LH estão o estímulo à produção de esteróides e fatores do crescimento intrafoliculares, também envolvidos no desvio folicular (Ginther et al., 2001). Além disso, o LH

está envolvido no processo de ovulação, quando da ativação do centro hipotalâmico liberador de GnRH pelo aumento da concentração de estradiol e redução na progesterona, que aumenta a frequência dos pulsos de liberação de LH, levando a um pico pré-ovulatório do mesmo, que desencadeia o processo da ovulação (Evans et al., 1997).

### 2.1.5 Inibina

A inibina, proteína classificada, juntamente com ativina e folistatina, como membro da superfamília das TGF- $\beta$ , apresenta duas formas conhecidas, inibina-A e inibina-B. Possui, como ação biológica, efeito de *feedback* negativo sobre a liberação de FSH, aparentemente através de efeito direto sobre a hipófise (Phillips, 2005). A inibina, secretada principalmente pelas células da teca, aumenta sua concentração com a emergência da onda folicular, a qual reduz-se após a seleção do folículo dominante, para novamente aumentar, possivelmente devido ao estímulo do folículo dominante (Bleach et al., 2001). A concentração de inibina-A aumenta juntamente com a redução da concentração de FSH, sugerindo que esta pode ser sua forma ativa. Por mecanismo parácrino, a inibina-A pode estar envolvida no estímulo da produção de andrógenos pelas células da teca, e na de estrógeno, pelas células da granulosa do folículo dominante (Ginther et al., 2003).

## 2.2 Dinâmica folicular

O ciclo estral bovino é caracterizado por uma série de ondas foliculares, com o crescimento folicular seguindo um padrão cíclico (Boni et al., 1997). O ovário bovino apresenta recrutamento folicular contínuo através de fatores intra e extra-ovarianos (Driancourt, 1991). Cada onda folicular é precedida de um aumento da concentração de FSH, que inicia o crescimento de um tratamento de folículos maiores que 3 mm de diâmetro. Nos próximos três dias há o crescimento deste tratamento de folículos, chegando ao total de 20-24 folículos, os quais atingem diâmetro superior a 4 mm. Aproximadamente no dia 3 do ciclo, considerando o dia do estro como dia 0, os primeiros folículos a serem recrutados atingem o tamanho de 8mm, enquanto os demais alcançam o tamanho de 4-6 mm. Neste estágio, um dos maiores folículos acelera seu desenvolvimento, processo denominado como desvio folicular,

tornando-se dominante e fazendo com que, através do aumento da concentração de estradiol e conseqüente redução na concentração de FSH, os demais folículos se tornem subordinados (Ginther et al., 1996). Então, o maior folículo subordinado cessa seu crescimento, no quinto dia, aos 8,0 mm de diâmetro (Garcia e Salaheddine, 1998), enquanto o folículo dominante atinge seu diâmetro máximo no sexto dia, permanecendo funcional por mais 2 a 4 dias (fase dominante) (Merton et al., 2003). O folículo dominante perde a dominância entre os dias 8 e 10, levando ao recrutamento de uma nova onda folicular. Com a luteólise, o folículo dominante da última onda folicular, acompanhado do aumento da frequência dos pulsos e pico de LH, inicia a maturação final e ovula (Ginther et al., 1996). Os folículos que foram recrutados, tornando-se dependentes de FSH, e que não atingiram o estágio de desenvolvimento suficiente para ovulação tornam-se atresícos, por apoptose (Goodhand et al., 1999).

## 2.3 Sincronização da onda folicular

Com o aprofundamento dos conhecimentos sobre a dinâmica folicular, tornou-se possível a manipulação do desenvolvimento folicular em bovinos. Varias alternativas, mecânicas ou hormonais têm sido usadas para o controle folicular tanto em *Bos taurus* como em *Bos indicus*.

O uso do estradiol para sincronizar a onda folicular se baseia em seu efeito supressor do crescimento folicular (Bó et al., 2002), tal como a progesterona (Adams et al, 1992; Burke et al., 1994), e em seu poder de induzir atresia folicular (Bó et al., 1995). O mecanismo de supressão do crescimento folicular por parte do estradiol envolve a inibição da liberação de FSH. A Uma vez metabolizado o estradiol sistêmico, o FSH volta a ser liberado em maior quantidade na circulação e uma nova onda folicular emerge (Bó et al., 2002) A supressão do crescimento folicular e, conseqüentemente, o controle sobre a emergência de uma nova onda com o uso de estradiol é maior quando este é usado concomitantemente com progesterona (Caccia e Bó, 1998). A administração de estradiol-17 $\beta$  em vacas com implantes de progesterona causou a emergência de uma nova onda em  $4,3 \pm 0,2$  dias (Bó et al., 1994; 1995). O benzoato de estradiol, (BE) administrado junto com progesterona, causou a emergência de uma nova onda  $4,1 \pm 0,1$  dias (Moreno et al., 2001) e  $4,0 \pm 0,1$  dias depois (Caccia e Bó, 1998).

Semelhante ao que acontece fisiologicamente, a aspiração folicular pode induzir e sincronizar uma nova onda folicular. Tomando-se o dia da aspiração como ponto de referência (dia 0), a detecção da emergência de uma nova onda pode ser realizada antes do dia 2. Utilizando a aspiração folicular para sincronizar a onda folicular de animais *Bos indicus*, Buratini et al. (2000) observaram que a emergência da nova onda folicular ocorreu  $1,9 \pm 0,1$  e a ovulação 6 dias após a ablação do folículo dominante. No primeiro dia o número total de folículos é baixo, aumentando no segundo dia após a aspiração (Garcia e Salaheddine, 1998). No terceiro dia a população folicular já se encontra em seu limite máximo, não havendo diferença entre o terceiro, o quarto e o quinto dias (Goodhand et al., 1999). A seleção folicular ocorre, em média,  $3,4 \pm 0,7$  dias após a aspiração, com diâmetro folicular médio de  $8,0 \pm 1,0$  e  $6,0 \pm 1,3$  mm para o folículo dominante e o maior subordinado, respectivamente (Garcia e Salaheddine, 1998).

#### 2.4 Capacidade do ovócito em produzir embriões *in vitro*

A capacidade de um ovócito em desenvolver-se até blastocisto em um sistema de produção *in vitro* não depende somente de fatores intrínsecos, mas está relacionada ao processo de PIVE, ao espermatozóide, à doadora e ao método de coleta do ovócito (Hendricksen et al., 2000). Além disso, o crescimento do ovócito dentro do folículo ovariano é determinado por vários fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*. Estes fatores incluem tamanho folicular, dia do ciclo estral, nível de atresia e influência de outros folículos, tal como o folículo dominante (Castilho e Garcia, 2005).

O ovócito adquire capacidade para desenvolver-se *in vitro* até o estágio de blastocisto, quando o folículo que o originou atinge de 2 a 3mm de diâmetro (Hendricksen et al., 2000). No bovino, o ovócito e o folículo crescem de forma contínua até o folículo atingir o diâmetro de 3 mm, com o ovócito alcançando 120-130  $\mu\text{m}$  e permanecendo com esta dimensão até antes da ovulação, quando o folículo mede entre 15 e 20 mm em taurinos (Fair et al., 1995). Com o crescimento do ovócito ocorrem mudanças no mesmo, como proliferação e reestruturação das organelas citoplasmáticas. Há aparecimento do espaço perivitelino, redução da quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso e migração de mitocôndrias, complexo de Golgi e grânulos

corticais para a periferia do citoplasma. Além disso, o ovócito atinge capacidade transcricional, acumulando RNA mensageiro, ribossomos e polipeptídeos, fundamentais na fase final de seu desenvolvimento (Fair, 2003). Estudos mostram maior produção de blastocisto com ovócitos oriundos de folículos maiores que 6 mm de diâmetro comparado com ovócitos de folículos de 2 a 6 mm (Lonergan et al., 1994; Hageman et al., 1999). Além disso, Arlotto et al. (1996), avaliando a capacidade de desenvolvimento de ovócitos de diferentes tamanhos, mostraram que somente ovócitos maiores que 115  $\mu\text{m}$  possuem taxa de produção de embriões acima de 30%.

Como a dinâmica folicular em bovinos se caracteriza por possuir, na maioria das vezes, 2 ou 3 ondas de crescimento folicular, tanto em *Bos Indicus* (Figueiredo et al., 1997) como em *Bos taurus* (Ginther et al., 1989), torna-se possível realizar a recuperação de ovócitos por via transvaginal durante todo o ciclo estral (Galli et al., 2003). Machatková et al. (1996) mostraram que ovócitos aspirados nos dias 14 e 16 do ciclo estral produzem mais blastocistos que os aspirados nos dias 7, 8 e 9. Vassena et al. (2003), aspirando doadoras nos dias 2, 3, 5 e 7 do início do ciclo estral, concluíram que aspirações realizadas no final da fase estática dos folículos subordinados (dia 5) aumentam o potencial de produção de embriões em relação a aspirações realizadas nas fases de crescimento (dia 2), início da fase estática (dia 3) e regressão dos folículos subordinados (dia 7). Os autores especularam que, possivelmente, devido ao breve período em que os folículos ficam sob efeito da dominância folicular eles sofrem discreta degeneração dos ovócitos, a qual não afeta de forma intensa sua capacidade de se tornarem embriões.

O complexo cumulus-ovócito do folículo é a última parte a ser afetada no processo de atresia. Em folículos que apresentam sinais de atresia avançada, somente 25% dos ovócitos mostram claros sinais de degeneração, com os demais ovócitos apresentando taxa de blastocisto semelhante aos oriundos de folículos não atrésicos (Hendricksen et al., 2000). Wit et al. (2000) afirmam existir alta correlação entre o grau de atresia do folículo e qualidade do ovócito, com os folículos não atrésicos ou com atresia moderada apresentando ovócitos com maior capacidade de produção de embriões. Estudos indicam que um grau médio de atresia folicular não prejudica a capacidade do ovócito (Campbell et al., 1991), podendo sua capacidade de desenvolvimento ser até aumentada com baixo grau de atresia (Blondin e Sirard, 1995). Isto pode ser explicado por mudanças estruturais associadas à degeneração em

ovócitos oriundos de folículos subordinados (Blondin et al., 1997), as quais se assemelham às ocorridas em ovócitos de folículos pré-ovulatórios (Assey et al., 1994).

Petyim et al. (2003), afirmaram que a presença do folículo dominante, através da indução da atresia dos folículos subordinados, afeta negativamente o número de folículos disponíveis para aspiração e o número de ovócitos recuperados. Uma vez que a atresia folicular é induzida durante a fase de dominância da onda folicular, o autor assume que a qualidade dos ovócitos oriundos de folículos subordinados pode ser afetada. Hagemann et al. (1999) verificaram que ovócitos oriundos de folículos subordinados possuem menor capacidade de produzir embrião que ovócitos oriundos de folículos em crescimento. Hendricksen et al. (2004), aspirando folículos nos dias 2, 5 e 8 do ciclo estral encontraram redução da capacidade dos ovócitos em desenvolverem-se até blastocisto durante a fase de dominância (dia 8), mas não durante o início da fase de dominância (dia 5), apresentando resultados semelhantes aos da fase de crescimento folicular (dia 2). Entretanto, Smith et al. (1996) não encontraram diferença na produção de embriões em animais em fase de crescimento e dominância folicular, concluindo que o folículo dominante afeta negativamente a competência dos ovócitos oriundos de folículos subordinados, somente quando provoca um grau avançado de atresia.

## 2.5 Protocolos de aspiração folicular para a produção *in vitro* de embriões

Diferentes protocolos de aspiração folicular têm sido descritos na literatura. Neles estão incluídas aspirações em diferentes dias do ciclo estral, como nos dias 3-4, 9-10 ou 15-16 após o dia do estro (Pieterse et al., 1991), e diferentes intervalos entre sessões de aspiração, com aspirações com intervalo de 48 e 96 horas (Simon et al., 1993), semanais (Goodhand, et al., 1999), ou duas vezes por semana (Gibbons et al., 1994). De modo geral, é aceito que o intervalo entre aspirações de 4 a 5 dias une a maximização do número de ovócitos aspirados com a qualidade dos mesmos para a produção *in vitro* (Galli et al., 2001).

Aspirações a cada 7 dias (semanais) possibilitam obter um maior número de complexos cumulus-oophorus (CCOs), comparando-se com intervalos de 3 ou 4 dias (Kastrop et al., 1991). Porém, tanto a qualidade dos CCOs quanto a taxa de blastocistos são maiores em intervalos de 3 dias entre aspirações. Isto pode ser explicado pelo fato de após 3 dias da aspiração haver dominância folicular, e o folículo dominante exercer um efeito negativo no desenvolvimento dos ovócitos presentes em folículos subordinados (Merton et al., 2003).

Na tentativa de melhorar os resultados obtidos com a técnica de aspiração folicular, faz-se o uso de FSH em associação aos protocolos que consideram as fases do ciclo estral e intervalo entre aspirações. O uso de FSH, além de não permitir a dominância folicular, tem efeito sobre a sincronização da população folicular, avançando o desenvolvimento dos folículos e iniciando a maturação oocitária ainda *in vivo* (Gibbons et al., 1994).

Goodhand et al. (1999) afirmaram que o tratamento com FSH aumentou o número de folículos disponíveis, mas apresentou queda na taxa de recuperação dos ovócitos. Entretanto, a utilização de FSH por longo período pode reduzir o número de folículos disponíveis devido a luteinização das células foliculares (Stubbings e Walton, 1995). Bungartz et al. (1995) afirmaram que não há benefício em se usar tratamento com FSH em protocolo de duas aspirações semanais, pois a maior frequência de aspirações já resulta em aumento da concentração endógena de FSH. Blondin et al. (2002) descreveram que a manipulação hormonal da população folicular com FSH pode produzir até 80% de blastocistos, com a aspiração folicular realizada dois dias após a última administração de FSH e 6 horas após a administração de LH.

Chaubal et al. (2006) avaliando cinco protocolos de aspiração folicular por um período de 10 semanas, concluíram que o protocolo com duas aspirações semanais possibilitou melhor desempenho, quando comparado com uma aspiração semanal. Entretanto, o protocolo consistindo na remoção do folículo dominante três dias antes da aspiração, associada ao tratamento com FSH e uma aspiração semanal mostrou-se ter maior viabilidade comercial.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

O experimento foi realizado no Campo Experimental Sucupira, na parte que engloba a Estação Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Localiza-se a Sudoeste da cidade de Brasília – DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02'W), com altitudes que variam de 1050 a 1250m. O clima predominante é o tropical chuvoso, indicando invernos secos e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 1763,118ha, distribuída em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (WALTER e SAMPAIO, 1998).

#### 3.2 Animais e tratamentos

##### 3.2.1 Experimento 1

Doze novilhas mestiças (½ Simental X ½ Nelore) foram divididas aleatoriamente em três tratamentos, com três réplicas cada, com todos os animais participando de todos os tratamentos. Os animais foram mantidos em pastagem Tanzânia, além de água e suplemento mineral à vontade. Todas as novilhas foram sincronizadas com implante auricular de norgestomet (Crestar,

Intervet, Brasil) por sete dias, seguido da administração im de análogo de PGF2 $\alpha$  (Prolise, ARSA S.R.L., Argentina) e aspiração de todos os folículos maiores que 3mm de diâmetro, para constituição dos tratamentos 2X, 1X e 1X-BE, conforme descrito adiante. Após isto, os folículos das novilhas do tratamento 2X foram aspirados duas vezes por semana, com intervalo de quatro e três dias, e os das novilhas dos tratamentos 1X e 1X-BE foram aspirados com intervalo de sete dias. As novilhas do tratamento 1X-BE receberam 2mg de benzoato de estradiol (Ric-BE, ARSA S.R.L., Argentina) imediatamente após a aspiração folicular (Figura 1). Durante todo o experimento as novilhas permaneceram com o implante de norgestomet, que foi substituído a cada 14 dias. Avaliações, por ultra-sonografia, do número de folículos maiores que 3mm de diâmetro e do tamanho do maior folículo foram realizadas no momento da aspiração folicular. Durante uma semana, entre os dias 14 e 21 (Figura 1), foi realizado exame ultra-sonográfico diário dos ovários, para avaliar a dinâmica folicular, e coletada amostra de sangue, para a mensuração da concentração de FSH, segundo metodologia descrita adiante.

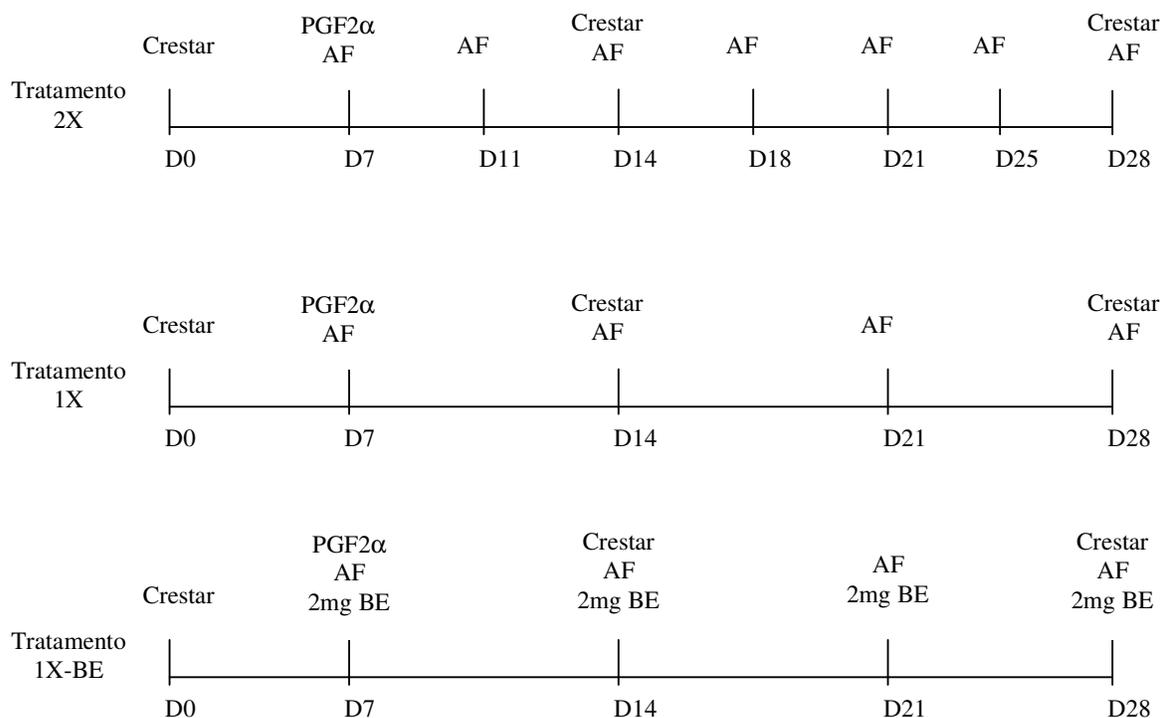


Figura 1 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 1  
 Crestar – implante auricular de norgestomet  
 PGF2 $\alpha$  – análogo de prostaglandina F2 $\alpha$   
 AF – aspiração folicular  
 2mg BE – 2mg de benzoato de estradiol.

### 3.2.2 Experimento 2

Doze novilhas mestiças (½ Simental X ½ Nelore) foram divididas aleatoriamente em três tratamentos, num delineamento em que todos os animais participaram de todos os tratamentos. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizanta*, com água e mineral à vontade, e suplementados com 15Kg/dia de silagem de milho e 0,5Kg de sal proteinado. As novilhas foram sincronizadas com implante intravaginal de progesterona (DIB, ARSA S.R.L., Argentina) por sete dias, seguidos da administração im de análogo de PGF2 $\alpha$  (Prolise, ARSA S.R.L., Argentina) e aspiração dos folículos maiores que 3mm de diâmetro para constituição dos tratamentos 0BE, 2BE e 5BE, conforme

descrito adiante. Após isto, os folículos das novilhas de todos os tratamentos foram aspirados com intervalo de sete dias. As novilhas do tratamento 0BE não receberam injeção de benzoato de estradiol, enquanto as dos tratamentos 2BE e 5BE receberam 2mg e 5mg de benzoato de estradiol (Ric-BE, ARSA S.R.L., Argentina), respectivamente, imediatamente após a aspiração folicular (Figura 2). Durante todo o experimento as novilhas permaneceram com o implante de progesterona, que foi substituído a cada 14 dias. Durante uma semana, entre os dias 14 e 21 (Figura 2), foi realizado, diariamente, exame do ovário por ultra-sonografia, para avaliar a dinâmica folicular, e coletada amostra de sangue, para a mensuração da concentração de FSH, conforme descrito adiante.

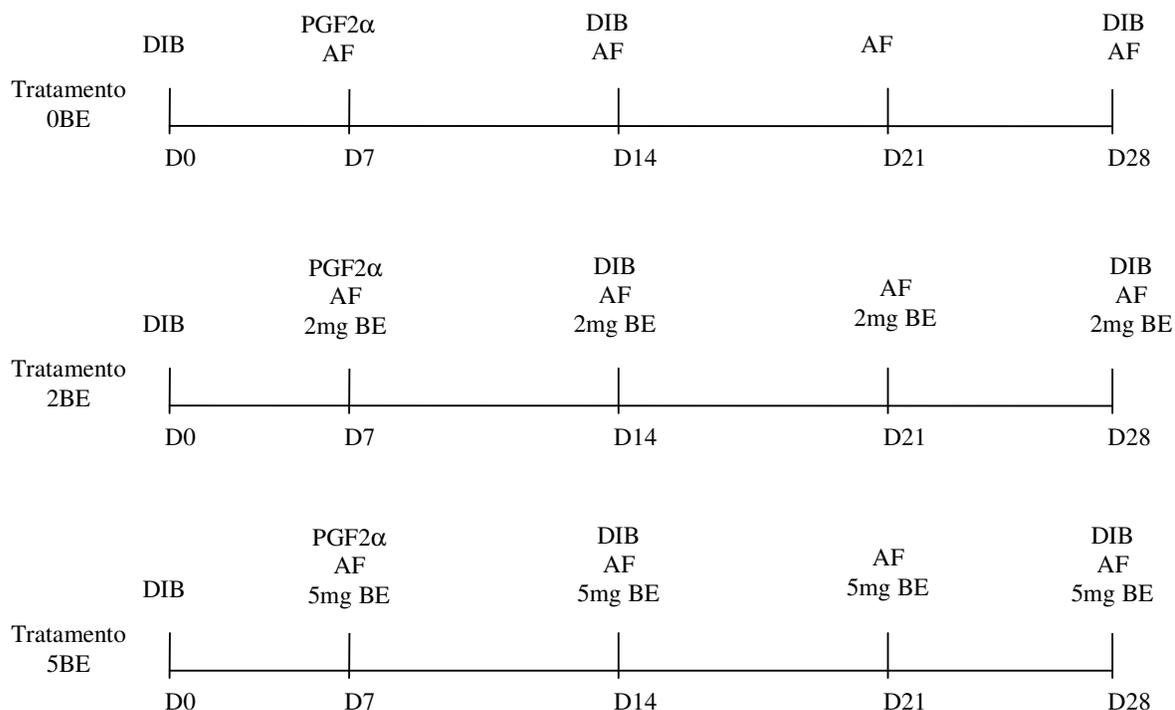


Figura 2 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 2  
DIB – dispositivo intravaginal bovino contendo progesterona (DIB, ARSA S.R.L., Argentina)  
PGF2α – análogo de prostaglandina F2α  
AF – aspiração folicular  
2mg BE – 2mg de benzoato de estradiol  
5mg BE – 5mg de benzoato de estradiol.

### 3.2.3 Experimento 3

Quinze novilhas mestiças (½ Simental X ½ Nelore) foram divididas aleatoriamente em três tratamentos, com três réplicas cada. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria Brizanta*, com água e sal mineralizado à vontade. As novilhas foram sincronizadas com 2mg de BE(Ric-BE, ARSA S.R.L., Argentina) e implante intravaginal de progesterona (DIB, ARSA S.R.L., Argentina) por oito dias seguidos da administração im de análogo de PGF2α (Prolise, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) e retirada do implante. No quarto dia após o estro, as novilhas receberam um novo implante de progesterona, o qual foi mantido nas mesmas até o final do experimento, quando os folículos maiores que 3mm de diâmetro foram aspirados. No sétimo dia após o estro foi

administrada PGF2α (Prolise, ARSA S.R.L., Argentina), para constituição dos tratamentos 0h-BE, -12h-BE e -24h-BE, conforme descrito adiante. Após isto, as novilhas do tratamento 0h-BE (n=5), -12h-BE (n=6) e -24h-BE (n=4) receberam 2mg de benzoato de estradiol imediatamente após a aspiração folicular e 12 e 24 horas antes. Avaliações, por ultra-sonografia, do número de folículos maiores que 3mm de diâmetro e do tamanho do maior folículo foram realizadas no momento da aspiração folicular (Figura 3). Durante todo o experimento, entre os dias 11 e 18 (Figura 3), foi realizado, diariamente, exame do ovário por ultra-sonografia, para avaliar a dinâmica folicular, e coletada amostra de sangue, para a mensuração da concentração de FSH, semelhante ao descrito no Experimento 1.

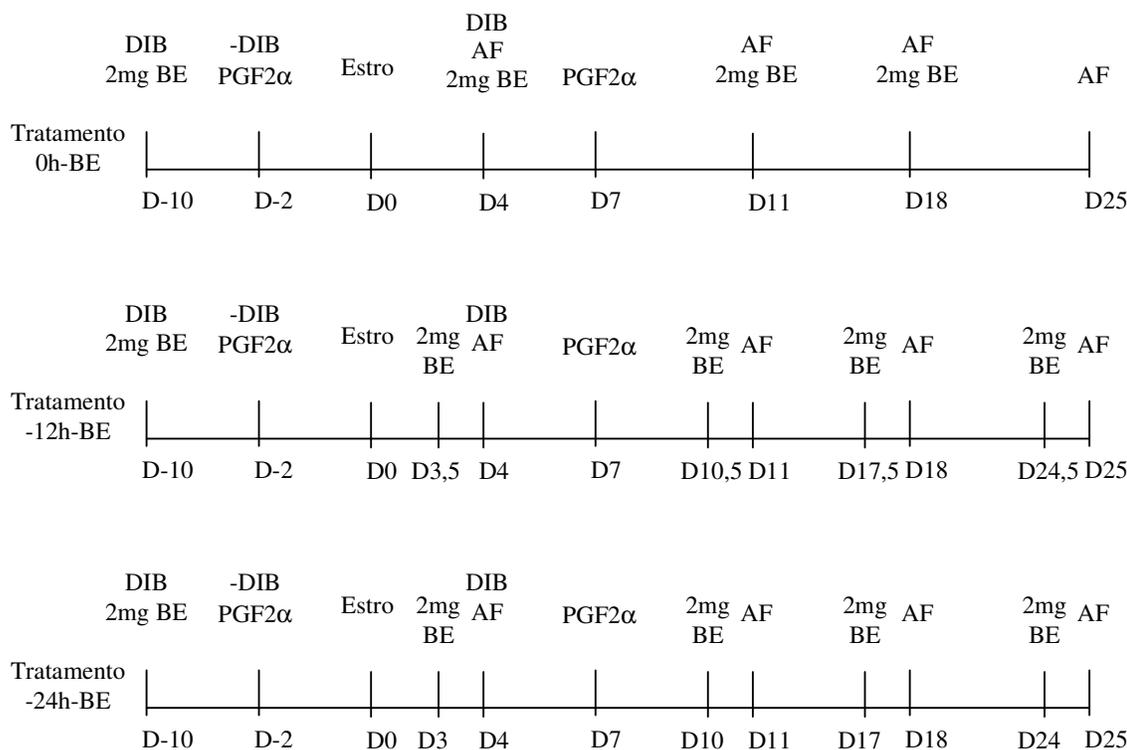


Figura 3 – Cronograma representando os tratamentos utilizados no Experimento 3  
 DIB – dispositivo intravaginal bovino contendo progesterona (DIB, ARSA S.R.L., Argentina)  
 -DIB – retirada do dispositivo intravaginal bovino contendo progesterona  
 PGF2α – análogo de prostaglandina F2α  
 AF – aspiração folicular  
 2mg BE – 2mg de benzoato de estradiol.

### 3.3 Aspiração folicular

A aspiração folicular (AF) foi realizada com auxílio de um aparelho de ultra-som (Aloka SSD-500, Japão) equipado com uma sonda transvaginal com transdutor convexo de 5 MHz (Aloka USD994T-5, Japão) associado a um sistema de agulha longa. Previamente à AF, os animais tinham o reto esvaziado e a região perineal e vulva lavadas, com água corrente e detergente, e assepsiada com álcool 70%. Em seguida, foi realizada anestesia epidural baixa com 3ml de lidocaína 2% (Pearson, Eurofarma, Brasil). Durante as sessões de AF, todos os folículos maiores que 3mm de diâmetro foram posicionados sob a linha de punção e aspirados com uma agulha de cateter 16G (Jelco, Johnson e Johnson, Bélgica) conectada a um sistema de punção (Handle Cook, Austrália) acoplado a um tubo de polipropileno de 50ml (TPP, Suíça), onde o fluido folicular era armazenado. O fluido folicular foi aspirado com pressão negativa contínua de 80mmHg, taxa de

fluxo equivalente a 13ml/min, com auxílio de uma bomba de vácuo (Cook VMAR-5100, Austrália). Antes e depois da aspiração, o sistema de agulha era limpo com meio de punção contendo D-PBS, 1% de soro fetal bovino e 5 UI/ml de heparina sódica.

### 3.4 Avaliação do ovócito e produção in vitro de embriões (PIVE)

Após a aspiração, o conteúdo de todos os folículos aspirados oriundos do mesmo animal era transportado ao laboratório, onde era lavado com D-PBS e filtrado com filtro de embriões contendo malha com porosidade de 75 µm. O conteúdo retido no filtro era transferido para uma placa de Petri e examinado, com auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss - Stemi SV6, Alemanha), para se encontrar os ovócitos. Encontrados, os ovócitos eram avaliados por sua qualidade, de acordo com sua morfologia, e

classificados como: grau I – contendo mais de três camadas de células do *cumulus oophorus* compactas e citoplasma homogêneo; grau II – de uma a três camadas de células do cumulus compacta e citoplasma relativamente homogêneo, com regiões escuras em sua periferia; grau III – uma camada de células do cumulus e citoplasma heterogêneo e escuro; e grau IV – desnudo, expandido, atrésico ou degenerado. Os ovócitos viáveis (grau I, II e III), no Experimento 1, e todos os ovócitos, no Experimento 3, foram utilizados para a PIVE. Na maturação, os ovócitos eram colocados, individualmente por novilha, em gotas de 200 µl de meio de maturação submersas em óleo mineral e incubadas (Napco 6200, USA) por 22-26 horas a 39°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar. Depois de maturados, os ovócitos foram fecundados por 18 horas em gotas de 200 µl de meio de fecundação. Durante todo o experimento foi utilizado somente uma partida de sêmen de alta fertilidade após congelamento e descongelamento. O sêmen foi centrifugado (Sigma 3K10, Alemanha) com 4 ml de gradiente de percoll 45 e 90% em sp-Talp a 700 g por 20 minutos. O *pellet* de espermatozóides formado foi homogeneizado e re-centrifugado com 1 ml de meio de capacitação a 700 g por 5 minutos. Em seguida, o *pellet* de espermatozóides foi homogeneizado com 200 µl de meio de fecundação final, após o que 1 x 10<sup>6</sup> espermatozóides foram adicionados à gota contendo os ovócitos para fecundação. Após a fecundação, os ovócitos foram cultivados em gotas de 200µl de meio de cultivo por sete dias. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas 48 e 168 horas após a fecundação.

### 3.5 *Ultra-sonografia ovariana e das características da onda folicular*

A ultra-sonografia ovariana foi realizada com auxílio de um aparelho de ultra-som (Aloka SSD-500, Japão) equipado com transdutor linear de 7,5 MHz (Aloka, Japão). O dia da emergência da nova

onda folicular foi definido como o primeiro dia após a aspiração folicular no qual dois folículos não identificados como oriundos da onda anterior, e não aspirados, atingiram de 4 a 5mm de diâmetro. O desvio folicular foi detectado, segundo Ginther et al. (1996), no momento no qual observou-se diferença na taxa de crescimento do futuro folículo dominante em relação ao maior folículo subordinado.

### 3.6 *Coleta de sangue e análise hormonal*

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção coccígea, usando agulha 21G (Precision Glide Vacutainer, Becton Dickinson, USA) e tubo plástico de 10ml (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Brasil), durante um período de sete dias contados a partir da aspiração folicular. As amostras de sangue foram centrifugadas (Fanem – Excelsa II modelo 206BL, Brasil) por 10 minutos e o soro armazenado em tubos de 1,5ml a -20°C até a análise da concentração de FSH. Para a análise da concentração de FSH foi utilizado o anticorpo primário NIDDK-anti-oFSH-I-2 e o marcador radioativo e antígeno simples USDA-bFSH-I-2. A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 0,05 ng/ml e 5,2%, respectivamente.

### 3.7 *Análise estatística*

Todas as variáveis contínuas apresentaram homoscedasticidade e distribuição normal, segundo o teste de Cochran e de Lilliefors, respectivamente. As variáveis contínuas foram analisadas por análise de variância, com a comparação de médias feita pelo teste de Duncan. Os dados com distribuição binomial foram analisados por qui-quadrado. Para a análise estatística foi utilizado o programa SAEG.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dinâmica Folicular

No Experimento 1, não foi encontrada diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos 2X, 1X e 1X-BE para o diâmetro do maior folículo nos dias 1, 2, 3, 4 e 6 após a aspiração folicular. No dia 5, dia seguinte à segunda aspiração folicular nas novilhas aspiradas duas vezes por semana (tratamento 2X), o diâmetro do maior folículo foi maior ( $P<0,05$ ) nas novilhas dos tratamentos 1X e 1X-BE do que nas novilhas do tratamento 2X (Figura 4). O padrão de crescimento folicular após a aspiração folicular foi semelhante ao encontrado por Cavalieri et al. (2001), com a emergência de uma nova onda folicular ocorrendo poucos dias

após a aspiração. Seria esperado que nas novilhas tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol (BE) (tratamento 1X-BE), o padrão de crescimento folicular fosse alterado pelo bloqueio da emergência da nova onda por aproximadamente quatro dias (Caccia e Bó, 1998; Moreno et al., 2001), o que faria com que o maior folículo das novilhas tratadas com BE acompanhasse o crescimento do maior folículo das novilhas aspiradas duas vezes por semana, após a segunda aspiração (dia 4). Entretanto, o crescimento do maior folículo das novilhas do tratamento 1X-BE foi semelhante ao das novilhas do tratamento 1X, não tratadas com BE e aspiradas uma vez por semana.

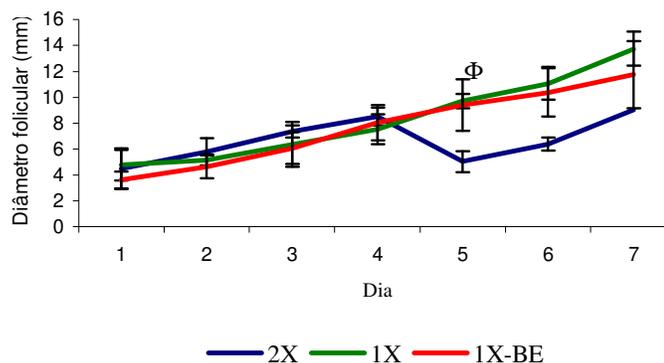


Figura 4 – Média e DP do diâmetro do maior folículo, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).

Φ Houve diferença ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos (tratamento 1X = 1X-BE > 2X).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos 2X, 1X e 1X-BE na concentração sérica de FSH nos dias 1, 2, 3, 4, 6 e 7 após a aspiração folicular (Figura 5), apresentando-se de forma semelhante a obtida por Ginther et al. (1999), com animais em condições fisiológicas, e Cavalieri et al. (2001), com vacas submetidas a aspiração folicular. A concentração sérica de FSH normalmente flutua durante o ciclo estral, alcançando concentração máxima quando o futuro

folículo dominante encontra-se com aproximadamente 4mm de diâmetro, sofrendo progressiva redução, até sua concentração basal, no momento do desvio folicular (Mihm e Bleach, 2003). Protocolos associando progestágenos e estradiol causam supressão dose-dependente na liberação de FSH e LH (O'Rourke et al, 2000; Martinez et al., 2005), mas esta supressão não é tão intensa quanto a observada no momento do desvio folicular (Ginther et al, 2001; 2003), quando existe

quantidade de gonadotrofinas suficiente apenas para manter ativo o processo esteroidogênico do folículo dominante. Neste experimento a concentração sérica de FSH aumentou após a aspiração folicular, com redução gradual até próximo do desvio folicular, como ocorre fisiologicamente nos três tratamentos utilizados. Entretanto, seria esperado que, nas novilhas tratadas com progestágeno e BE, a concentração de FSH permanecesse basal até três a quatro dias após a administração do BE, semelhante ao encontrado por Martinez et al. (2005), devido o *feedback* negativo do estradiol sobre a secreção de FSH. Com isso, esperava-se que o FSH alcançasse concentração máxima no dia 5 após a administração do BE e da aspiração folicular, nas novilhas do tratamento 1X-BE, semelhante ao

ocorrido nas novilhas aspiradas duas vezes por semana após a segunda aspiração (dia 4). Entretanto, no dia 5, a concentração sérica de FSH foi maior na novilhas aspiradas duas vezes por semana (tratamento 2X) que nas novilhas aspiradas uma vez por semana e tratadas com progestágeno e BE (tratamento 1X-BE), que por sua vez foi maior que nas novilhas aspiradas uma vez por semana e sem BE (1X) (Figura 5). Estes resultados mostram que o tratamento com progestágeno e BE não foi capaz de manter a concentração de FSH basal durante quatro dias e evitar o crescimento folicular durante este período, embora tenha aumentado a concentração de FSH após os quatro dias, indicando alteração no padrão de desenvolvimento folicular.

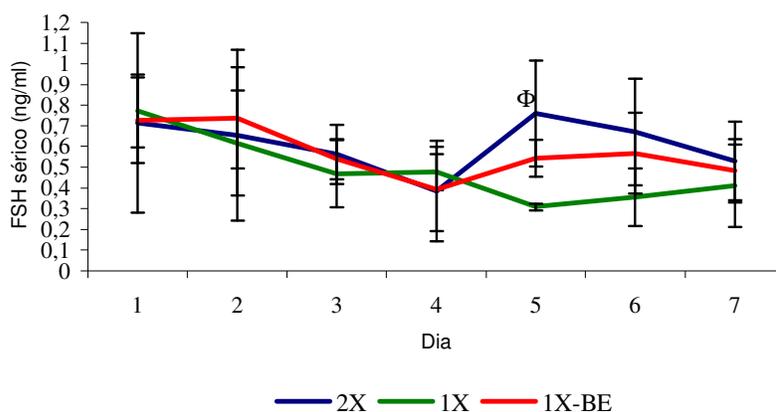


Figura 5 – Média e DP da concentração sérica de FSH, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).

<sup>Φ</sup> Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos (tratamento 2X > 1X-BE > 1X).

O intervalo entre a aspiração folicular e a emergência e desvio da onda folicular obtido neste experimento assemelha-se ao obtido por Garcia e Salaheddine (1998), Buratini et al. (2000) e Cavalieri et al. (2001). Não houve diferença entre os tratamentos no dia da emergência e do desvio da onda folicular, bem como no tamanho do folículo dominante no momento do desvio folicular (Tabela 1). O uso de progestágeno associado ao estradiol causa emergência de uma nova onda folicular em aproximadamente quatro dias após a administração (Bó et al., 1995;

Martinez et al., 2005). Os resultados deste experimento mostram que a emergência da onda folicular, tanto nas novilhas tratadas quanto nas não tratadas com BE, ocorreu aproximadamente dois dias após a aspiração folicular, semelhante ao obtido por (Caccia e Bó, 1998) no tratamento de animais que não recebeu tratamento com progesterona e benzoato de estradiol para sincronização folicular. O tamanho do maior folículo no momento do desvio folicular foi menor que o obtido por Garcia e Salaheddine (1998) e semelhante ao obtido por Figueiredo et al. (1997).

Tabela 1 – Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).

Parâmetros	Tratamentos		
	2X	1X	1X-BE
Número de novilhas	4	4	4
Dia da emergência da onda folicular	1,3±0,5	2,0±0	2,5±0,6
Dia do desvio folicular	2,7±0,5	3,2±1,0	3,2±0,5
Diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular	6,3±1,5	6,3±0,8	6,1±1,3

(P>0,05)

A Figura 6 mostra aumento no número de folículos maiores que 5mm de diâmetro até três dias após a aspiração folicular, período que coincide com a fase de crescimento folicular. A partir do dia 4, após o desvio folicular e conseqüentemente na fase de dominância, ocorreu estabilização e posterior redução do número de folículos maiores que 5mm, resultados que assemelham-se aos obtidos por Hendricken et al.

(2004) e dão consistência aos resultados referentes ao desenvolvimento folicular e concentração sérica de FSH obtidos neste experimento. Além disso, sinaliza atraso no desenvolvimento folicular nas novilhas tratadas com progestágeno e BE (tratamento 1X-BE), indicando que o tratamento, embora não tenha sido capaz de sincronizar a emergência da onda folicular em quatro dias, alterou seu padrão de crescimento.

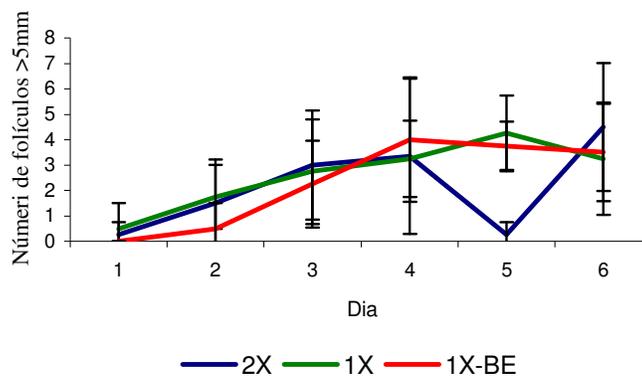


Figura 6 – Média e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (7 dias), em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE).

O tamanho do maior folículo, no momento da aspiração folicular, para os tratamentos 2X, 1X e 1X-BE foi 9,59±2,51mm, 12,90±1,12mm e 11,09±1,84mm, respectivamente. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Gibbons et al. (1994), Boni et al. (1997) e Garcia e Salaheddine (1998), em animais *Bos taurus*, e superiores aos obtidos por Viana et al. (2004), em animais *Bos indicus*, para animais aspirados uma vez por semana e inferiores para animais aspirados duas vezes por semana. A hipótese que sucessivas aspirações podem ter efeito sobre o padrão de secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, sobre a taxa de crescimento folicular (Viana et al., 2004), não foi confirmada neste experimento,

utilizando como modelo animais mestiços *Bos taurus X Bos indicus*.

O tamanho do maior folículo no momento da aspiração folicular (dia 7) foi maior (P<0,05) nas novilhas do tratamento 1X que nas do tratamento 1X-BE, que foi maior que nas do tratamento 2X. Utilizando progestágeno e BE no momento da aspiração de novilhas aspiradas com intervalo de sete dias (tratamento 1X-BE), seria esperado que o maior folículo aspirado no tratamento 2X apresentasse tamanho semelhante ao do tratamento 1X-BE, com ambos apresentando tamanho inferior ao do tratamento 1X. Entretanto, os resultados deste experimento mostram que os animais do tratamento 1X-BE apresentaram

tamanho do maior foliculo intermediário ao tratamento 1X e 2X, confirmando que o tratamento com progesterona e 2mg de benzoato de estradiol não foi capaz de sincronizar a emergência da onda folicular em quatro dias.

Segundo Tohei et al. (2001), há redução na concentração de estradiol até 24h após a aspiração folicular. Como a aspiração folicular retira todos os foliculos que podem ser visualizados por ultra-sonografia, isto é, aqueles maiores que 3mm de diâmetro, a sincronização da onda folicular pode ter sido comprometida pela ausência de uma população folicular capaz de produzir uma quantidade de estradiol necessária para, juntamente com os 2mg de BE administrados via exógena, causar *feedback* negativo sobre a liberação de FSH e, conseqüentemente, bloquear do desenvolvimento folicular.

Quando foi aumentada a dose de benzoato de estradiol para 5mg, Experimento 2, o padrão de

crescimento folicular foi semelhante ao obtido no Experimento 1, tanto para as novilhas que não receberam BE [tratamento 1X (Experimento 1) e 0BE (Experimento 2)] quanto para as que receberam BE [tratamento 1X-BE (Experimento 1) e tratamentos 2BE e 5BE (Experimento 2)]. O diâmetro do maior foliculo foi maior ( $P>0,05$ ) nas novilhas que não receberam BE (tratamento 0BE) que nas novilhas que receberam 2mg (tratamento 2BE) e 5mg (tratamento 5BE) de benzoato de estradiol após a aspiração folicular, que não diferiram entre si, nos sete dias que sucederam a aspiração folicular (Figura 7). A semelhança da curva de crescimento folicular nos animais tratados com 5mg de BE (tratamento 5BE) com a dos animais tratados com 2mg de BE (tratamento 2BE) mostra que o aumento na dose de BE não foi suficiente para sincronizar a onda folicular em novilhas submetidas à aspiração folicular.

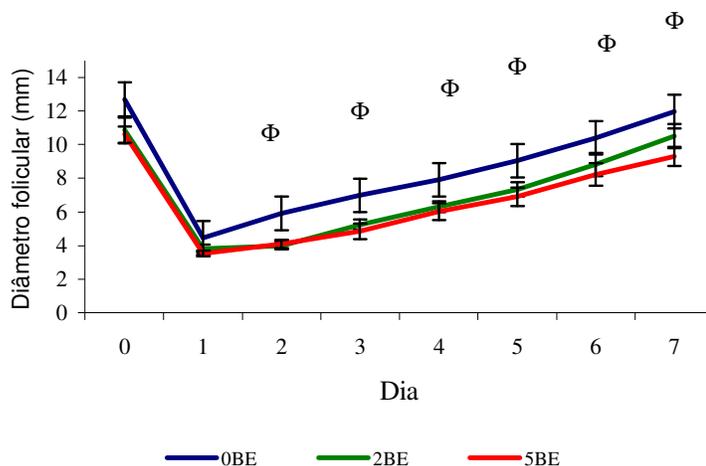


Figura 7 – Média e DP do diâmetro do maior foliculo, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE).

Φ Houve diferença ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos (tratamento 0BE > 2BE = 5BE).

O intervalo entre a aspiração folicular e a emergência e desvio da onda folicular neste experimento foi semelhante ao obtido no experimento anterior, quando consideradas as novilhas não tratadas [tratamento 1X (Experimento 1) e tratamento 0BE (Experimento 2)] e tratadas com BE [tratamento 1X-BE (Experimento 1) e tratamentos 2BE e 5BE (Experimento 2)]. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) no dia da emergência e do desvio da onda folicular entre os tratamentos

(Tabela 2). Estes resultados mostram que mesmo com o aumento da dose de BE a emergência da onda folicular, nas novilhas tratadas ou não com BE, ocorreu aproximadamente dois dias após a aspiração folicular, semelhante ao experimento anterior. O tamanho do maior foliculo no momento do desvio folicular não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 2).

A Figura 8 mostra, como no experimento anterior, houve aumento no número de foliculos

maiores que 5mm de diâmetro logo após a aspiração folicular nas novilhas não tratadas com BE. Além disso, mostra aumento do número destes folículos dois dias após a aspiração nas novilhas tratadas com 2 e 5mg de BE, sugerindo atraso na emergência da onda folicular. Entretanto, este atraso de um dia não foi suficiente para prevenir a presença de dominância folicular no momento da aspiração seguinte, sete dias após.

Os resultados deste experimento mostram que o uso de BE associado a progesterona não é capaz de sincronizar a emergência da onda folicular em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias. Segundo Phillips (2005), a inibina possui o efeito de suprimir a secreção de FSH em mamíferos. A imunização da inibina aumenta a

concentração plasmática de FSH e a taxa de ovulação em bovinos (Kaneko et al, 1995; 1997), sugerindo que a inibina possui um papel importante na regulação da secreção de FSH nesta espécie. Segundo Tohei et al. (2001), a concentração de inibina apresenta acentuada redução até 36 horas após a aspiração folicular. O não efeito do BE sobre a sincronização da onda folicular, mesmo com o aumento da dose, sugere a necessidade da presença de fatores de crescimento e hormônios inerentes aos folículos, como a inibina, no processo de regulação do crescimento folicular (Fortune et al., 2004), que podem ter suas concentrações reduzidas pelo processo de aspiração folicular e retirada mecânica da maioria da população de folículos antrais.

Tabela 2 – Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE)

Parâmetros	Tratamentos		
	0BE	2BE	5BE
Número de novilhas	10	10	9
Dia da emergência da onda folicular	1,7±0,5	2,6±0,5	2,7±0,7
Dia do desvio folicular	3,5±0,9	3,7±1,1	4,0±1,0
Tamanho do maior folículo no dia do desvio folicular	6,8±1,0	6,0±0,8	6,0±0,9

(P>0,05)

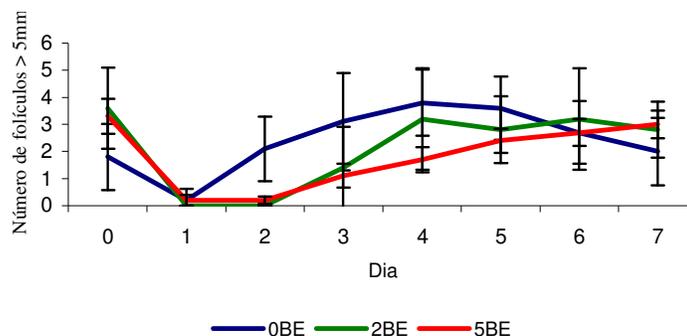


Figura 8 – Média e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona e aspiradas uma vez por semana (0BE), tratadas com progesterona e 2mg de BE (2BE) e tratadas com progesterona e 5mg de BE (5BE).

Quando a administração de BE foi antecipada (Experimento 3) 24 (tratamento -24h-BE) e 12 horas (tratamento -12h-BE) e realizada imediatamente após a aspiração folicular (tratamento 0h-BE), o padrão de crescimento folicular foi semelhante ao obtido nos experimentos 1 e 2, quando comparadas às novilhas que receberam BE. Não houve diferença no diâmetro do maior folículo (P>0,05), entre

novilhas que receberam BE nos diferentes momentos que antecederam a aspiração folicular, durante os sete dias de intervalo entre aspirações (Figura 9). Estes resultados mostram que a antecipação da administração de BE em relação à aspiração folicular, quando administrado ainda na presença de folículos, não preveniu a emergência da onda folicular logo após a aspiração.



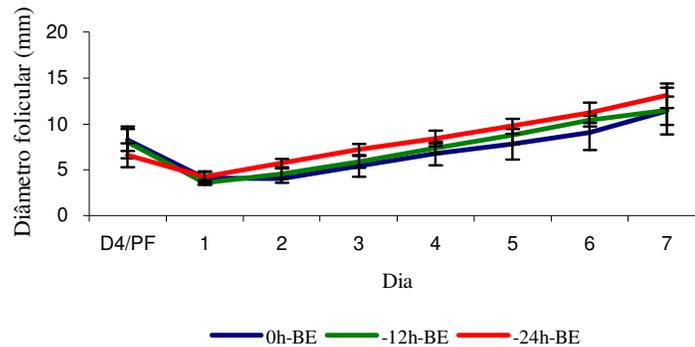


Figura 9 – Média e DP do diâmetro do maior folículo, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE). ( $P>0,05$ ).

O intervalo entre a aspiração folicular e a emergência e desvio da onda folicular, no Experimento 3, foi semelhante aos obtidos nos experimentos anteriores, quando consideradas as novilhas tratadas com BE. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) no dia da emergência e do desvio da onda folicular entre os tratamentos (Tabela 3). Estes resultados mostram que mesmo com a antecipação na administração de BE em relação a aspiração folicular, o dia da emergência ocorreu aproximadamente dois dias e o do desvio folicular quatro dias após a aspiração folicular, semelhante aos resultados encontrados por Austin et al. (2002) em novilhas, durante a primeira onda folicular do

ciclo estral, e nos experimentos 1 e 2. O tamanho do maior folículo no momento do desvio folicular não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 3).

A Figura 10 mostra, como nos experimentos anteriores, aumento no número de folículos maiores que 5mm de diâmetro aproximadamente dois dias após a aspiração folicular independentemente do momento em que as novilhas receberam benzoato de estradiol, sugerindo que a antecipação da administração do BE não foi capaz de prevenir a emergência da onda folicular por mais de dois dias.

Tabela 3 - Média±DP do dia da emergência folicular, dia do desvio folicular e diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular, em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE)

Parâmetros	Tratamentos		
	0h-BE	-12h-BE	-24h-BE
Número de novilhas	4	5	5
Dia da emergência da onda folicular	1,7±1,0	1,5±0,6	1,2±0,5
Dia do desvio folicular	4,0±0,8	3,7±0,5	3,2±0,4
Diâmetro do maior folículo no dia do desvio folicular	8,3±0,8	7,5±1,3	7,7±0,5

( $P>0,05$ )

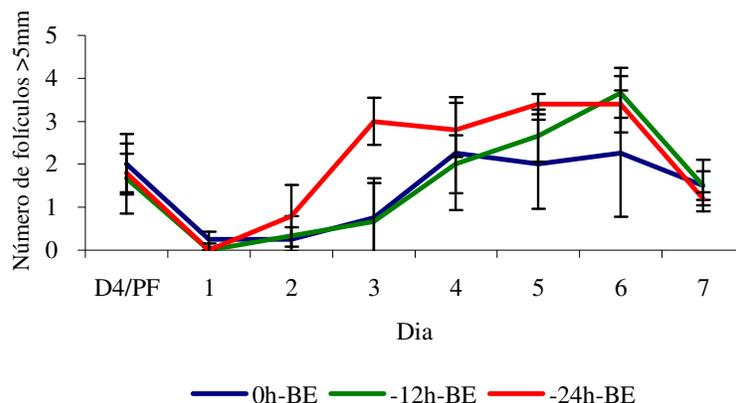


Figura 10 – Media e DP do número de folículos maiores que 5mm, entre aspirações (sete dias), em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE). ( $P>0,05$ ).

O tamanho do maior folículo no dia da aspiração folicular foi  $11,37\pm 2,54$ ,  $11,94\pm 1,53$  e  $13,00\pm 1,25$  nas novilhas dos tratamentos 0h-BE, -12h-BE e -24h-BE, respectivamente, não apresentando diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. A mudança de progéstágeno para progesterona e o uso de BE na presença de folículos nos ovários (tratamentos -24h e -12h), com subsequente aspiração dos mesmos, não se mostrou eficaz para sincronizar a onda folicular, não retardando sua emergência e evitando que, na aspiração seguinte, o maior folículo presente tenha alcançado a dominância. Estes resultados sinalizam para a necessidade da presença de fatores inerentes aos folículos, não somente no início do estímulo para atresia folicular, causado pela progesterona e BE, mas durante os quatro dias que antecederiam a emergência da onda folicular.

#### 4.2 Aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões

No Experimento 1, o número de folículos aspirados e ovócitos recuperados por sessão de aspiração foi semelhante ao obtido por Stubbings e Walton (1995) e Goodhand et al. (1999) e superior ao obtido por Petyim et al. (2003). As novilhas do tratamento 1X-BE tiveram mais folículos na aspiração folicular ( $P<0,05$ ) que as do tratamento 2X, com as novilhas do tratamento 1X sendo intermediárias e não diferindo das demais. Não

houve diferença no número médio de ovócitos viáveis e totais recuperados entre os tratamentos (Tabela 4). Garcia e Salaheddine (1998) reportaram aumento no número de folículos aspirados por sessão de aspiração em novilhas aspiradas duas vezes por semana. Esse experimento mostra menor número de folículos aspirados, por sessão de aspiração, em novilhas aspiradas duas vezes por semana, comparado com novilhas aspiradas uma vez por semana e que receberam BE. Isto pode ter ocorrido pela presença de BE, que embora não tenha prevenido a presença do folículo dominante no momento da aspiração, alterou o padrão de crescimento da onda folicular, reduzindo o efeito inibitório da dominância sobre o crescimento folicular. Por outro lado, se considerada a quantidade semanal de folículos aspirados, o resultado obtido para o tratamento 2X dobraria, podendo este superar os demais, resultado que se assemelharia ao obtido por Goodhand et al. (1999). Além disso, este estudo, ao contrário de Garcia e Salaheddine (1998) e Kastrop et al. (1991), que sugerem aumento no número de ovócitos recuperados em animais aspirados com intervalo de três e quatro dias (duas vezes por semana) e sete dias (uma vez por semana), respectivamente, e à semelhança do encontrado por Chaubal et al. (2006), indica semelhança na recuperação de ovócitos em novilhas aspiradas duas e uma vez por semana e tratadas ou não com progéstágeno e benzoato de estradiol. Isto pode ter ocorrido pelo fato de nenhum dos tratamentos ter prevenido a presença

do folículo dominante no momento da aspiração subsequente, e este exercer um efeito supressivo no desenvolvimento folicular (Merton et al., 2003). Além disso, as novilhas de todos os tratamentos tiveram a luteólise induzida e receberam implante de progesterona. Esta estratégia preveniu a presença de corpo lúteo, mantendo a concentração de progesterona, benéfica para a qualidade do ovócito. Segundo Pfeifer et al. (2005), o uso de progesterona exógena aumenta o número total de ovócitos recuperados, bem como o número de ovócitos grau I e II e o número de folículos disponíveis para aspiração folicular. A ausência de corpo lúteo no momento da aspiração folicular pode facilitar o procedimento de aspiração,

permitindo aumento na recuperação de ovócitos. A ausência de corpo lúteo pode explicar, pelo menos parcialmente, algumas das diferenças obtidas no presente experimento quando comparado com outros estudos.

A média de ovócitos clivados e embriões produzidos foi superior às obtidas por Bols et al. (1998) e Goodhand et al. (2000) e semelhante às obtidas por Bungartz et al. (1995), apresentando-se superiores ou semelhantes aos valores de referência. Não houve diferença entre os tratamentos na média de ovócitos clivados e blastocistos produzidos por novilha por sessão de aspiração (Tabela 4).

Tabela 4 – Média±DP do número de folículos aspirados, ovócitos recuperados, ovócitos clivados e blastocistos produzidos, por novilha, por sessão de aspiração, em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE)

Tratamento	2X	1X	1X-BE
Número de folículos	527	595	555
Média de folículos/ novilha/AF	14,1±5,5 <sup>b</sup>	15,9±4,1 <sup>ab</sup>	17,5±4,3 <sup>a</sup>
Ovócitos totais recuperados	325	457	404
Média de ovócitos totais/ novilha/AF	9,6±3,7	12,7±4,5	12,3±6,1
Ovócitos viáveis recuperados e cultivados	191	267	231
Média de ovócitos viáveis/ novilha/AF	5,8±3,2	7,3±3,1	7,0±3,8
Ovócitos clivados	131	181	157
Média de ovócitos clivados/novilha/AF	3,8±2,5	5,0±2,8	4,8±2,7
Blastocistos produzidos	74	120	102
Média de blastocistos/ novilha/AF	2,1±2,0	3,3±2,2	3,1±1,8

<sup>a,b,c</sup> Valores seguidos de letras diferentes sobrescritas, na mesma coluna, diferem (P<0,05) pelo teste de Duncan.

As taxas de clivagem e de blastocisto foram similares entre os tratamentos 2X, 1X e 1X-BE (Figura 11). Segundo Goodhand et al. (1999), a capacidade dos CCOs em desenvolver-se até blastocistos é maior em intervalos de três dias entre aspirações. Hagemann (1999), relatou efeito supressivo do folículo dominante sobre o tamanho e competência dos demais ovócitos e Hendricksen et al (2004), aspirando ovócitos de folículos oriundos de três estádios de crescimento da onda folicular, observaram que a presença de folículo dominante pode reduzir a capacidade de desenvolvimento de ovócitos oriundos dos folículos subordinados. Como a sincronização da onda folicular com progestágeno e BE não se mostrou eficaz, o não aumento das taxas de clivagem e blastocisto nos animais tratados (1X-BE) em relação aos não tratados (1X), é considerado esperado. Entretanto, era esperado aumento desses índices nos animais aspirados duas

vezes na semana (2X), que apresentavam crescimento folicular de aproximadamente um dia, o que não foi confirmado neste experimento. Estudos em ovinos e bovinos indicam que um pequeno grau de atresia não prejudica a competência do ovócito (Campbell et al, 1991; Matton et al., 1981), podendo até aumentar sua capacidade de desenvolver-se até blastocisto (Vassena et al., 2003). Isto pode ser explicado pelas mudanças estruturais associadas à degeneração dos ovócitos oriundos de folículos subordinados (Blondin et al., 1997), as quais são similares às que ocorrem em ovócitos oriundos de folículos pré-ovulatórios (Assey et al., 1994). Possivelmente, o efeito negativo da dominância folicular, este mais evidente no tratamento 1X, sobre a qualidade dos ovócitos, não tenha ocorrido em proporção capaz de prejudicar a produção embrionária.

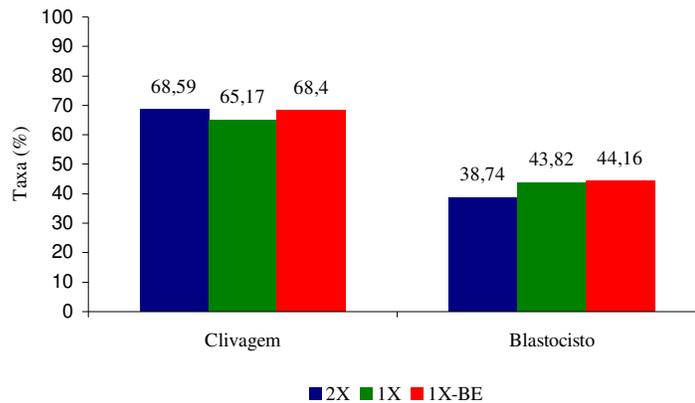


Figura 11 – Taxa de clivagem e de blastocisto em novilhas tratadas com progestágeno e aspiradas duas vezes por semana (2X), tratadas com progestágeno e aspiradas uma vez por semana (1X) e tratadas com progestágeno e benzoato de estradiol e aspiradas uma vez por semana (1X-BE) ( $P>0,05$ ).

Quando a administração de BE foi antecipada (Experimento 3) 24 (tratamento -24h) e 12 horas (tratamento -12h) e realizada imediatamente após a aspiração folicular (tratamento 0h), houve redução do número de folículos aspirados e ovócitos recuperados em relação aos resultados obtidos no Experimento 1. Alguns estudos mostram a influência da estação do ano (Alvarez et al., 2000), no que diz respeito ao fotoperíodo (Rhodes et al. 1995a), temperatura (Wolfenson et al., 2000) e nutrição (Rhodes et al. 1995b; 1996), sobre algumas características do ciclo estral e do padrão de crescimento folicular em *Bos indicus* e *Bos taurus*. A redução no

número de folículos aspirados e ovócitos recuperados entre os experimentos pode ter ocorrido devido a diferença de estação do ano em que foram realizados os experimentos, com o primeiro sendo executado no período de chuva e o terceiro na seca. Devido a não eficácia dos tratamentos na sincronização da onda folicular, não houve diferença ( $P>0,05$ ) no número de folículos aspirados, ovócitos totais e ovócitos viáveis recuperados por novilha por sessão de aspiração, bem como para a média de ovócitos clivados e blastocistos produzidos (Tabela 5), entre os tratamentos.

Tabela 5 - Média±DP de folículos aspirados, ovócitos recuperados, ovócitos clivados e blastocistos produzidos, por novilha, por sessão de aspiração, em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE)

Tratamento	0h-BE	-12h-BE	-24h-BE
Número de folículos	144	224	175
Média de folículos/ novilha/AF	12,0±5,1	12,4±3,7	11,7±5,0
Ovócitos totais recuperados e cultivados	103	156	118
Média de ovócitos totais/ novilha/AF	8,9±4,8	8,7±4,3	7,9±4,2
Ovócitos viáveis recuperados	27	62	44
Média de ovócitos viáveis/ novilha/AF	2,2±2,2	3,4±1,6	2,8±3,4
Ovócitos clivados	58	81	75
Média de ovócitos clivados/novilha/AF	4,8±3,1	4,5±2,0	5,0±2,7
Blastocistos produzidos	36	34	29
Média de blastocistos/ novilha/AF	3,0±1,9	2,2±0,8	1,9±1,9

( $P>0,05$ )

A taxa de clivagem foi semelhante para todos os tratamentos. Entretanto, a taxa de blastocisto foi maior ( $P<0,05$ ) para as novilhas que

receberam BE imediatamente após a aspiração folicular (tratamento 0h) que para as que receberam 12h antes (tratamento -12h), com as

novilhas que receberam 24h antes (tratamento - 24h) apresentando taxa intermediária (Figura 12). A redução da taxa de blastocisto nas novilhas que receberam BE antes da aspiração folicular pode ter

ocorrido devido a indução da atresia folicular pelo BE exógeno (Bó et al., 1995), prejudicando a qualidade do ovócito e sua capacidade de desenvolver-se até o estágio de blastocisto.

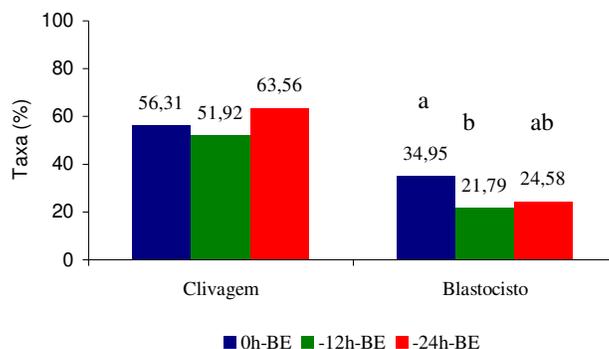


Figura 12 – Taxa de clivagem e de blastocisto em novilhas tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE no momento da aspiração folicular (0h-BE), tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 12h antes da aspiração folicular (-12h-BE) e tratadas com progesterona, aspiradas uma vez por semana e tratadas com BE 24h antes da aspiração folicular (-24h-BE).

<sup>a,b,c</sup> Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

Hendricksen et al. (2003) sugerem a presença de folículos em crescimento e em vários níveis de atresia durante os diferentes estágios de crescimento folicular. A semelhança na produção de embriões entre novilhas aspiradas duas vezes por semana e uma vez por semana, com ou sem benzoato de estradiol e em diferentes momentos de

administração antes da aspiração, observada nos experimentos deste trabalho, levanta dúvidas sobre a real importância da sincronização da onda folicular para a aspiração folicular sobre a capacidade dos ovócitos em desenvolverem-se até blastocisto.

## 5 CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, o uso de progestágeno ou progesterona associado a benzoato de estradiol não sincroniza a onda folicular em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias, não aumenta o número de folículos disponíveis para aspiração, bem como o número de ovócitos recuperados e blastocistos produzidos.

Com isso, seu uso, após a aspiração folicular, não é indicado como alternativa para otimizar a produção *in vitro* de embriões, em novilhas aspiradas com intervalo de sete dias.

Os resultados destes experimentos mostram que pouco se conhece sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina e de manipulação hormonal do ciclo estral.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.95, p.627-640, 1992.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTERMAN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1291-1302, 2000.
- ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, p.943-956, 1996.
- ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T. PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.37, p.335-344, 1994.
- AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. *Reproduction*, v.124, p.531-541, 2002.
- BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v.47, p.13-22, 1997.
- BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; FEIST, S. A.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod.*, v.64, p.743-752, 2001.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.41, p.54-62, 1995.
- BLONDIN, P.; GUIBAULT, L.; SIRARD, M. A.; The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the development competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, v.48, p.803-813, 1997.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 38-43, 2002.
- BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The use of estradiol-17 $\beta$  and progestogen treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. *Theriogenology*, v.41, p.165, 1994. abstr.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, v.43, p.31-40, 1995.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L. CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.
- BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complexes morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, p.1001-1014, 1996.
- BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and

- developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221-1236, 1997.
- BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOON, A.; DE KRUIF, A. Effect of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology*, v.49, p.983-995, 1998.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v.43, p.667-675, 1995.
- BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-431, 2000.
- BURKE, C. R.; MIHM, M.; MACMILLAN, K. L.; ROCHE, J. F. Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.35, p.27-39, 1994.
- BURKE, C. R.; BOLAND, M. P.; MACMILLAN, K. L. Ovarian responses to progesterone and estradiol benzoate administered intravaginally during dioestrous in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.55, p.23-33, 1999.
- CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol, benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v.49, p.341, 1998.
- CAMPBELL, B. K.; PICTON, H. M.; MANN, G. E.; McNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T., Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fert.*, v.93, p.81-96, 1991.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J. M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência ovocitária para produção in vitro de embriões – revisão. *Arch. Vet. Sci.*, v.10, p.17-23, 2005.
- CAVALIERI, J.; FARIN, P. W.; KINDER, J. E.; VAN CAMP, S. D.; WHITACRE, M. D.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Ovarian follicular development following administration of progesterone or aspiration of ovarian follicles in Holstein cows. *Theriogenology*, v.55, p.805-821, 2001.
- CHAUBAL, S. A.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, 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.
- DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v.35, p.55-79, 1991.
- EVANS A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 78, p. 289–306, 2003.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.*, v.42, p.437-442, 1995.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.203-206, 2003.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J. E.; RIVERE, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.109-126, 2004.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.
- 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.
- GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, v.50, p.575-585, 1998.
- GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405-419, 1994.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.20, p.187-200, 1989.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8-h through depression of FSH concentration. *Theriogenology*, v.52, p.1079-1093, 1999.
- GINTHER, O. J.; Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.61-79, 2000.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, v.64, p.197-205, 2001.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.239-257, 2003.
- GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vitro oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1999.
- GOODHAND, K. L.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, v.63, p.145-158, 2000.
- HADLEY, M. E. *Endocrinology*. 4 ed., Tucson:Prentice Hall, 1996. 518p.
- HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; DONNISON, M.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H. R. Development during single IVPs of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.*, v.53, p.451-458, 1999.
- HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*, v.51, p.757-765, 1999.
- HENDRICKSEN, P. J. M.; STEENWEG, W. M. N.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p. 909-920, 2004.
- HENDRICKSEN, P. J. M.; GADELLA, B. M.; VOS, P. L. A. M.; MULLAART, E.; KRUIP, A. M.; DIELEMAN, S. J. Follicular dynamics around the recruitment of the first follicular wave in the cow. *Biol. Reprod.*, v.69, p.2036-2044, 2003.
- HENDRICKSEN, P. M. J.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, v.53, p.11-20, 2000.
- KANEKO, H.; NAKANISHI, Y.; AKAGI, S.; ARAI, K.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWA, Y. Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cow. *Biol. Reprod.*, v.53, p.931-939, 1995.
- KANEKO, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; NOGUCHI, J.; KIUCHI, K.; SHIMADA, A.; HASEGAWA, Y. Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.14, p.263-271, 1997.
- KASTROP, P. M. M.; HULSHOF, C. J.; BEVERS, M. M.; DESTREE, O. H.; KRUIP, A.

- M. The effects of  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide on nuclear progression and on protein synthesis phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v.28, p.249-254, 1991.
- LAMMOGLIA, M. A.; SHORT, R. E.; BELLOWS, S. E.; BELLOWS, R. A.; MACNEIL, M. D.; HAFS, H. D. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F $2\alpha$ . *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1662-1670, 1998.
- LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicles size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v.37, p.48-53, 1994.
- MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.45, p.801-810, 1996.
- MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, G. A.; BÓ, G.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 86, p. 37-52, 2005.
- MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUTURE, Y.; DUFOUR, J. J. Growth and replacement of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, v.37, p.48-53, 1981.
- MERTON J. S.; De ROOS A. P. W.; MULLAART E.; DE RUIDH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-674, 2003.
- MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.217-237, 2003.
- MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M.L.; ORTISI, F.; BO, G. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v.55, p.408, 2001. abstr.
- O'ROURKE, M.; DISKIN, M. G.; SCREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of estradiol and FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, v.59, p.1-12, 2000.
- PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A. -S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, v.60, p.175-188, 2003.
- PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, A. M.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Characteristics on bovine oestrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, v.35, p.401-413, 1991.
- PFEIFER, L. F.; SCHNEIDER, A.; CASTILHO, E. M.; LUZ E. M.; ATAÍDE P. F.; DIONELLO N. J. L.; PIVATO I.; RUMPF R.; CORRÊA M. N. Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção *in vitro* de embriões. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19, 2005, Angra dos Reis, RJ. Porto Alegre:UFRGS, *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, Supl. 1, 2005. p. s184
- PHILLIPS, D. J. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, p. 1-16, 2005.
- PIVATO, I. *Efeito de diferentes tratamentos hormonais e nutrição de doadoras de ovócitos para a produção in vitro de embriões*. Pelotas:Universidade Federal de Pelotas, 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.
- RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.38, p.265-277, 1995a.
- RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in Bos indicus heifers before and after nutritional anestrus. *J. Reprod. Fertil.*, v.104, p.41-49, 1995b.
- RHODES, F. M.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Changes in ovarian function and

- gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1437-1443, 1996.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocytes maturation, fertilization and early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.234-248, 2002.
- SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GARVERICK, H. A. Effects of the presence of dominant follicle and exogenous estradiol on the duration of the luteal phase of the bovine estrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, v.115, p.15-21, 1999.
- SARTORI, R., SUAREZ-FERNANDEZ, C. A.; MONSON, R. L.; GUENTHER, J. N.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, v.60, p.1319-1330, 2003.
- SIMON, L.; BUNGARTZ, L.; RATH, D.; NIEMANN, H. Repeated bovine oocyte collection by means of permanently rinsed ultrasound guide aspiration unit. *Theriogenology*, v.39, p.312, 1993.
- SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.417-426, 1996.
- SMITH, L. C.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, N. P.; BHATIA, B.; PRICE, C. A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v.106, p.193-199, 1996.
- STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, v.43, p.705-712, 1995.
- TOHEI, A.; SHI, F. X.; AZAWA, M.; IMAI, K.; TAKAHASHI, H.; SHIMOHIRA, I.; KOJIMA, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol-17 $\beta$  and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. *J. Vet. Med. Sci.*, v.63, p.45-50, 2001.
- VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, v.60, p.923-932, 2003.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JUNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 84, p. 1-12, 2004.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.
- WALTER, B. M. T.; SAMPAIO, A. B. *A vegetação da fazenda sucupira*. Brasília:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 110p.
- WIT, A. C. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1277-1283, 2000.
- WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEDIAN, R. Impaired reproduction in heat stressed cattle: basis and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p535-547, 2000.
- WOLFSDORF, K. E.; DIAZ, T.; SCHMITT, E. J. P.; THATCHER, M. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology*, v.48, p.435-447, 1997.