

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
IN VITRO DE VACAS ESTIMULADAS COM HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA (eCG)

Autor: Luciana Vieira Pinto Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

MARINGÁ
Estado do Paraná
Julho – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

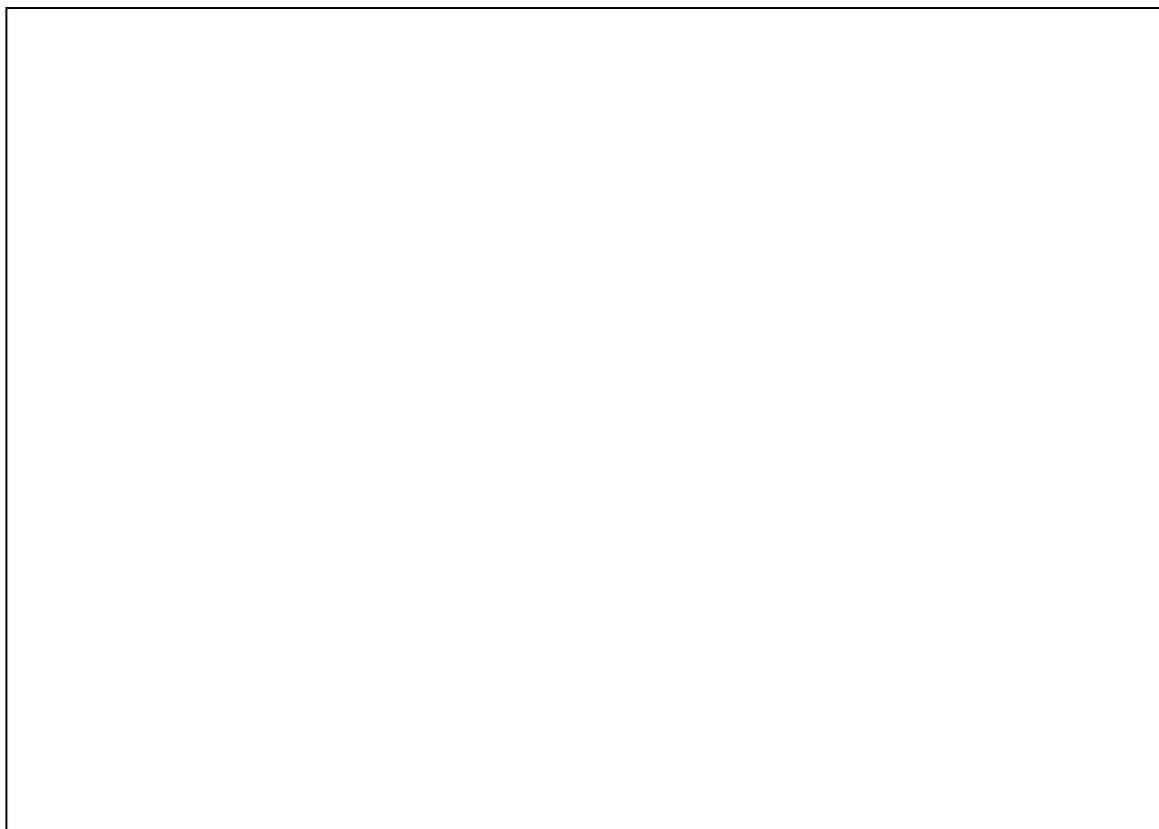
ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
IN VITRO DE VACAS ESTIMULADAS COM HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA (eCG)

Autor: Luciana Vieira Pinto Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Julho – 2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UEM



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
IN VITRO DE VACAS ESTIMULADAS COM HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA (eCG)

Autor: Luciana Vieira Pinto Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia – Área de concentração
Produção Animal

APROVADA: 10/07/2009

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

(Orientador)

"Existe um tempo certo para cada coisa, momento oportuno para cada propósito debaixo do Sol:

Tempo de nascer, tempo de morrer; tempo de plantar, tempo de colher"

(Eclesiastes 3:1-2).

Aos meus pais,

Zelia Vieira Pinto e Antonio Vieira Pinto

*Que acreditaram em mim algumas vezes mais do que eu mesma, por serem os maiores
incentivadores e alicerce em minha vida.*

Ao meu Amor,

Max Gimenez Ribeiro

*Pelo apoio, dedicação, paciência, por toda ajuda e incentivo durante as horas difíceis e
amor compartilhado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e pela benção da saúde;

Ao meu irmão Beto, meus sogros, Raul e Sandra, meus cunhados, Jo-An, Jackson, Ian, Denise e Alan, meus queridos sobrinhos Lucas, Lara e Rafela, meu agradecimento especial a vocês que estiveram incondicionalmente ao meu lado;

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia;

Ao Centro Universitário de Maringá (CESUMAR) e a todos os funcionários que estiveram envolvidos no experimento com tanta dedicação;

Ao Prof. Dr Luiz Paulo Rigolon, pela confiança em mim depositada. Agradeço a oportunidade de realização deste trabalho e os ensinamentos transmitidos durante a orientação;

Ao Prof. Antonio Campanha Martinez por acreditar e me dar força em todos os momentos em que precisei. Obrigada pela sua amizade;

Ao Prof. Dr Fábio Luiz Bim Cavalieri, meus agradecimentos pelos esforços dedicados ao experimento;

À Prof^a. Raquel Reis Martins, pelo companheirismo, conselhos, incentivo na busca deste ideal e acima de tudo pela amizade que iremos conservar por toda a vida;

À Prof^a. Marizângela, pela contribuição na análise dos dados estatísticos e profissionalismo;

Aos professores e amigos da UEM do curso de Medicina Veterinária (campus Umuarama), Juliano, Rejane, Maria José, Laís, Rita e Max que contribuíram cada um da sua maneira, para a realização deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da UEM, pelos ensinamentos. E ao funcionário da secretaria do PPZ, Denílson, pelos serviços prestados.

Aos amigos, Fabíola, Kesia, Juliana Quitzan, Carlão, que estiveram ao meu lado, mesmo que distantes, alguns presentes por mais tempo, outros menos, mas todos se mostrando sempre amigos;

A todos que estenderam a mão, por me ensinarem a caminhar.

BIOGRAFIA

LUCIANA VIEIRA PINTO RIBEIRO, filha de Antonio Vieira Pinto e Zélia Vieira Pinto, nasceu em Maringá, Paraná, no dia 14 de abril de 1981.

Concluiu sua formação no ensino fundamental e secundário no Colégio Marista, em 1998.

Em 1999 ingressou no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá, tornando-se Médica Veterinária no ano de 2004.

De 2004 a 2006 trabalhou como sócia proprietária do estabelecimento Recanto do Criador – Consultório Veterinário e Pet Shop, na cidade de Maringá.

Em outubro de 2005 casou-se com Max Gimenez Ribeiro.

Em janeiro de 2007 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon.

Em Fevereiro de 2008 foi aprovada em concurso público para Professora colaboradora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá – campus Umuarama, na qual exerce a função de docência nas disciplinas de Embriologia dos Animais Domésticos, Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias.

Em julho de 2009, submeteu-se à banca examinadora para defesa de sua dissertação de mestrado.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Aspiração folicular em bovinos.....	3
Seleção dos oócitos.....	3
Fatores relacionados ao sucesso da aspiração folicular.....	5
Aspectos mecânicos relacionados à aspiração.....	5
Aparelho de ultrassom.....	5
Tipos de agulhas.....	6
Pressões de vácuo.....	8
Dinâmica folicular.....	8
Folículos disponíveis para aspiração.....	11
Sincronização da emergência da onda folicular.....	12
Superovulação prévia à aspiração folicular.....	13
LITERATURA CITADA.....	14
ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> DE VACAS NELORE ESTIMULADAS COM FSH OU eCG	21
Resumo.....	21
Summary.....	22
Introdução.....	23
Material e métodos.....	24
Local.....	24
Animais e tratamentos.....	24
Lavagem e seleção dos oócitos.....	26
Maturação <i>in vitro</i>	27
Fecundação <i>in vitro</i>	27
Cultivo <i>in vitro</i>	27
Análise estatística.....	27
Resultados e discussão.....	28
Conclusões.....	33
Bibliografia.....	33

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA I. Resultados médios da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a qualidade dos oócitos viáveis de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade.....	28
TABELA II. Resultados médios da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção de oócitos inviáveis de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade.....	29
TABELA III. Resultados médios e desvio padrão da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões obtidos de aspiração vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1. Oócito de grau I.....	4
FIGURA 2. Oócito de grau II	4
FIGURA 3. Oócito de grau III	5
FIGURA 4. Oócito desnudo	5
FIGURA 5. Tipos de agulhas utilizadas durante a aspiração folicular, 20G (bulbo verde) e 18G (bulbo rosa)	6
FIGURA 6. População folicular disponíveis para aspiração. Nas figuras a, b, c e d podem ser observada uma imagem ultrassonográfica e o ovário de uma vaca com baixa população folicular (a e) e alta população folicular (b e d).....	12
FIGURA 7. Mecanismo de ação do progestágeno na sincronização da emergência da onda de crescimento folicular	13
FIGURA 8. Diagrama esquemático dos protocolos de estimulação e sincronização de ondas foliculares de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade.....	25

RESUMO

Avaliou-se a produção de oócitos aspiradas de vacas Nelore e a produção de embriões *in vitro*, de fêmeas que foram superestimuladas com FSH ou eCG. Foram utilizadas 42 vacas geneticamente homogêneas, com idade entre 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg de peso vivo, distribuídas em três grupos: 1 = Controle (n=14), Grupo 2 = tratadas com 1400UI de eCG (n=14) e Grupo 3 = tratadas com 120 UI de FSH, administrados com intervalo de 12 h, em 4 doses constantes (n=14). Os animais passaram por um período de adaptação de 45 dias, permanecendo em pastagem de *Cynodon* spp. e tiveram acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Após a separação em grupos todos os animais receberam implante auricular contendo 3 mg de Norgestomet no dia 0 associado a administração de 2 mg de benzoato de estradiol, via intramuscular. No dia 7 foram retirados os implantes de todos os animais e no dia 7 os ovários das vacas do grupo 1 foram aspirados (OPU). Os ovários das vacas do grupo 2 foram aspirados (OPU) no dia 7, sendo que a aplicação de eCG foi realizada no dia 5. Os ovários das vacas do grupo 3 foram aspirados (OPU) no dia 7, sendo que a aplicação de FSH foi iniciada no dia 5. O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom Aloka SSD-500 com transdutor microconvexo de 5 mHz, sendo que o mesmo foi adaptado a uma guia de aspiração específica para o sistema reprodutor de bovinos, conectado a um sistema de aspiração em tubo Falcon de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba Cook V-MAR 5000, ajustada entre 38 e 45 mmHg, permitindo um fluxo de 12 mL de meio/minuto. Foram realizadas 42 sessões de OPU com obtenção de 627 oócitos, sendo 502 viáveis e 125 inviáveis. A seguir realizou-se a maturação e a fecundação. Avaliou-se a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e taxa de eclosão. Não houve diferenças ($P > 0,05$) no número de oócitos

viáveis, na taxa de clivagem, taxa de blastocisto e taxa de eclosão em função do tratamento. Conclui-se que o estímulo gonadotrófico com 120 UI de FSH, em 4 doses por animal ou com 1400 UI de eCG por animal, foi insuficiente para incrementar o número de oócitos viáveis e PIV associados à técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom.

Palavras-chaves: FIV, OPU, reprodução animal.

ABSTRACT

It was evaluated the oocyte and *in vitro* embryo production of Nellore cows superstimulated with FSH and eCG. It was used 42 cows from the same genetic group, aging from 4 to 9 years, with mean body weight of 420 Kg, distributed into three groups: Group 1 = Control (n=14), Group 2 = supplementation with 1400UI of eCG (n=14) and Group 3 = supplementation with 120 UI of FSH, administered four times with 12h intervals (n=14). All animals had an adaptation time of 45 days, where they stayed in a *Cynodon* spp pasture. They had free access to water and mineral salt. After group separation the animals received an auricular implant of 3 mg of Norgestomet at day 0 with 2 mg of estradiol benzoate intramuscularly. At day 7 the implants were retrieved from all animals and cows from group 1 were submitted to ovarian aspiration (OPU) at this day. Group 2 had the OPU also during day 7 although they received a previous application of eCG at day 5. Group 3 had the OPU during the day 7 after a FSH administration at day 5. The follicular aspiration procedure was done using Aloka SSD-500 ultrasound equipment with a microconvex of 5 MHz transducer. This transducer was adapted to a specific aspiration guide for bovine reproductive system connected to an aspiration system with 50 ml Falcon tub. The vacuum pressure was obtained with a Cook V-MAR 500 pump, adjusted between 38 to 45 mmHg, allowing a flow of 12 ml of medium/minute. It was realized 42 OPU sessions which obtained 627 oocytes being, 502 viable and 125 non-viable. Then the oocyte maturation and fecundation was induced. It was evaluated the cleavage rate, blastocyst rate and eclusion rate. No difference ($p>0,05$) were found between groups regarding viable oocyte number, cleavage rate, blastocyst rate and eclusion rate. In conclusion, the gonodotrophic stimulation with four doses of 120 UI of FSH per animal and with 1.400

UI of ECG per animal was insufficient to increase the number of viable oocytes and PIV associates with the follicular aspiration technique guided with ultrasound.

Key-words: FIV, OPU, reproduction animal.

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo relatório de 2007 da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE) indica crescente produção brasileira de embriões *in vitro* (196.000), porém foram produzidos 70.000 embriões *in vivo* (Viana e Camargo, 2007), o que indica aproximadamente 15.000 superovulações por ano. Esses resultados destacam o Brasil no cenário mundial de produção de embriões. Atualmente, a área de reprodução bovina vem sendo explorada com maior intensidade, passando por mudanças e inovações biotecnológicas relevantes, resultado dos interesses de pesquisadores e criadores que visam difundir de forma rápida e lucrativa os materiais genéticos de alto potencial (Reichenbach et al., 2002).

A transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) possibilitam o aumento dos índices reprodutivos das fêmeas, intensificando a seleção dos animais. A utilização e o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução animal são condições para aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos (Reichenbach et al., 2002).

A Fertilização *in vitro* (FIV) é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao Melhoramento Genético, após a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embriões (TE). Em 1981 foram obtidos oócitos maduros, cirurgicamente de ovários ou de ovidutos de vacas estimuladas hormonalmente e, posteriormente, fertilizados e cultivados *in vitro* antes da transferência, o que resultou no nascimento do primeiro bezerro fertilizado *in vitro* (Brackett et al., 1982). Com a introdução da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum Pick-up* / OPU), seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas aumentou (Nibart et al., 1995). A OPU apresentou-se como uma alternativa na recuperação de oócitos de fêmeas com limitações reprodutivas,

mostrando-se mais ampla quando utilizada em fêmeas saudáveis e animais pré-púberes, produzindo quatro vezes mais embriões em relação a TE (Kruip et al., 1994), embora com maior custo por embrião (Rodrigues e Garcia, 2000).

Segundo Gonçalves et al. (2001), o objetivo da FIV é acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela aspiração *in vivo* de folículos guiada por ultrassonografia, especialmente em bovinos, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas, portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões.

Dentre as reconhecidas vantagens da técnica, está o fato de ser pouco invasiva, podendo ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, seja em animais pré-púberes ou em gestação inicial (Viana e Bols, 2005), o que se deve ao fato dos ovários manterem suas atividades durante a prenhez, tornando viável a recuperação dos oócitos (Knopf et al., 1989). Pieterse et al. (1991) fazendo punções em 21 vacas em 3 fases diferentes do ciclo estral (D3, D10, D16), não encontraram qualquer diferença entre as taxas de colheita, porém o número médio de oócitos colhidos aparentemente é maior nos primeiros dias do ciclo.

Para Meintjes et al. (1995), a aspiração folicular pode ser realizada até o terceiro mês de prenhez sem riscos à gestação e, para Sauvé (1998) até o sexto mês de prenhez. Utilizando-se a tecnologia da inseminação artificial consegue-se obter apenas um bezerro por vaca/ano, no caso da transferência de embriões pode-se obter de 20 a 25 bezerros por vaca/ano, já com a OPU-FIV este número aumenta para 80-100 bezerros vaca/ano. Leeuw (2006) concluiu que a OPU-FIV apresenta grande vantagem em relação ao número de bezerros nascidos por vaca por ano em relação as outras técnicas utilizadas.

O evidente crescimento da OPU contribuiu para sinalizar pontos críticos ao maior desenvolvimento da técnica, como o alto custo dos equipamentos, a alta variabilidade nas taxas de recuperação de oócitos e o reduzido número de protocolos de gonadotrofinas eficientes. Pode causar também lesões ovarianas e de tubas uterinas, aumento na incidência de cistos foliculares, enquanto a fertilização *in vitro* pode levar a perdas embrionárias precoces e nascimento de bezerros grandes, além de aumentar a incidência de partos distócicos, o que também foi evidenciado por vários autores (Gibbons et al., 1994; Kurykin et al., 2000; Petyim et al., 2001; Viana et al., 2003).

Aspiração folicular em bovinos

Inúmeras são as técnicas de aspiração folicular em bovinos. No caso de ovários provenientes de abatedouros, os oócitos podem ser obtidos por punção ou dissecação folicular, porém a colheita é efetuada por meio de punção folicular com agulha acoplada a uma seringa ou bomba de vácuo (Gonçalves et al., 2001).

Em decorrência de vários fatores indesejáveis de algumas técnicas, a ultrassonografia passou a ser utilizada. Tendo grande êxito a manipulação transretal com posicionamento dos ovários dorso-lateralmente na cavidade abdominal, possibilitando a sua visualização com um transdutor de 3.5 MHz posicionado sobre a pele, na região da fossa paralombar, local por onde se realiza a introdução da agulha para puncionar os folículos. Porém, a recuperação de oócitos bovinos utilizando a ultrassonografia ganhou grande impulso, um ano mais tarde após modificações que tornaram o procedimento mais fácil e rápido (Seneda et al., 2002).

Pieterse et al. (1988) alteraram a técnica descrita para humanos (Feichtinger e Kemeter, 1986) e descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultrassonografia, que tornou viável o aproveitamento de oócitos bovinos, sem as limitações dos procedimentos existentes até então. O procedimento é realizado através de uma agulha acoplada a probe conectada a uma bomba de vácuo, guiada por ultrassom transvaginal (Gonçalves et al., 2001).

Seleção dos oócitos

É chamado de complexo *cumulus-oócito* (CCO) o complexo formado pelo oócito envolto por células da granulosa, no interior do folículo. O termo corona radiata é utilizado para denominar o conjunto de células próximas da zona pelúcida. A proximidade entre as células do cumulus com o oócito faz com que elas tenham funções diferenciadas daquelas presentes na mural do folículo. Esta intimidade entre as células do cumulus com o oócito traz vantagens mútuas, como por exemplo: substâncias reguladoras produzidas pelo oócito que têm função importante na atividade das células do cumulus e, da mesma maneira, componentes dessas células somáticas quando estão presentes levam a melhores resultados de maturação, fecundação e de desenvolvimento embrionário, fato que evidencia a importância das células do cumulus na maturação do oócito *in vitro* (Gonçalves et al., 2001).

O seu potencial de maturação, fecundação e da capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos pode ser estimado pela aparência do CCO. Morfologicamente,

os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvida por várias camadas de células do cumulus dispostas de forma compacta. Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos na tentativa de identificar os de maior viabilidade. Classificação com escala de 1 a 4, considerando as características do cumulus (cobertura do oócito) e do citoplasma do oócito (ooplasma) (Gonçalves et al., 2001):

Qualidade 1: Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom (Figura 1).

Qualidade 2: Cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito com menos de 3 camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensada em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço interior da zona pelúcida (Figura 2).

Qualidade 3: Cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado (Figura 3).

Qualidade 4: Oócito desnudo sem cumulus (Figura 4).

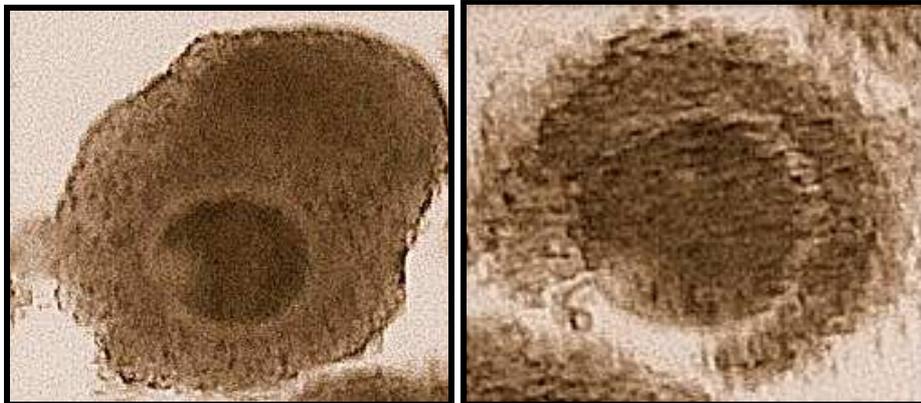


Figura 1. Oócito de grau I

Figura 2. Oócito de grau II

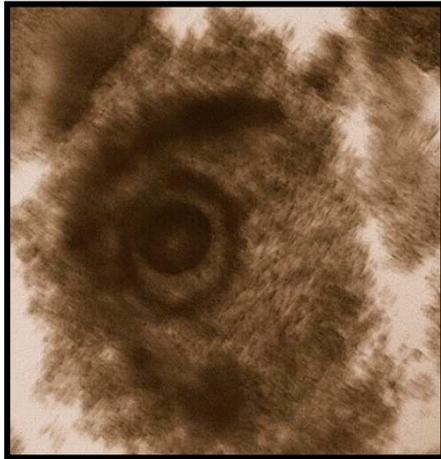


Figura 3. Oócito de grau III

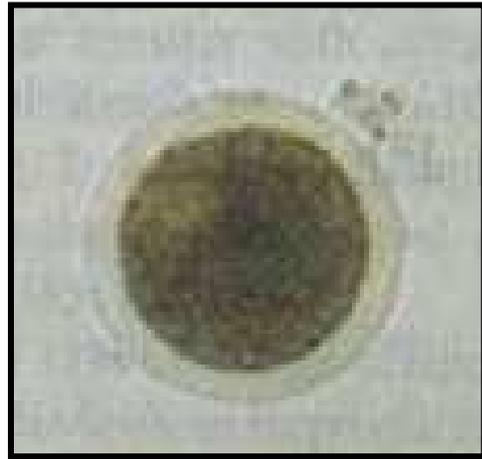


Figura 4. Oócito desnudo

Fatores relacionados ao sucesso da aspiração folicular

São inúmeros os fatores que controlam o sucesso da aspiração folicular transvaginal, que é medido parcialmente pela taxa de recuperação de oócitos com base no número de folículos aspirados. Podem ser divididos em fatores mecânicos como visualização dos folículos pelo equipamento de ultrassonografia, vácuo exercido pela bomba de aspiração, tipo de agulha e experiência do operador ou fatores biológicos como raça, espécie ou idade da doadora, pré-estimulação hormonal ou fase do ciclo estral na qual se realiza a aspiração folicular. (Bols et al., 2005).

Aspectos mecânicos relacionados à aspiração folicular

Um sistema de aspiração folicular apresenta três partes principais: 1) Aparelho de ultrassom; 2) Sistema de guia e agulhas; e 3) Bomba de vácuo, conectados a um recipiente coletor dos oócitos.

Aparelho de ultrassom

Nos programas de aspiração folicular e na reprodução assistida, em bovinos, podem ser utilizados diversos tipos de transdutores mecânicos ou eletrônicos. As frequências variam de 3 a 8 MHz. Esta decisão varia de acordo com a profundidade das estruturas a serem visualizadas, bem como o grau de definição exigido para uma boa eficiência do procedimento (Viana et al., 2002). Para a aspiração folicular guiada por ultrassom, as metodologias desenvolvidas foram propostas utilizando transdutores tanto lineares quanto convexos. O transdutor linear apresenta como principal desvantagem o espaço limitado entre o transdutor e a agulha, impedindo assim que todas as regiões do

ovário sejam puncionadas, mesmo modificando-se o posicionamento das gônadas. Já os transdutores do tipo convexo propiciam um procedimento mais rápido e fácil (Seneda et al., 2002).

Em relação a frequência existem relatos da utilização de transdutores de 5,0 MHz (Gibbons et al., 1994); 6,5 Mhz (Boni et al., 1997; Fry et al., 1997) e 7,5 Mhz (Bols et al., 1995). A variação da frequência do transdutor se dá principalmente pela melhor visualização dos oócitos, pode alterar sua taxa de recuperação, resultado observado quando se utiliza aparelhos com maior frequência (Hashimoto et al., 1999). Tais diferenças na resolução da imagem podem ser mais significativas principalmente em função da experiência do operador do equipamento (Fry et al., 1997).

Tipo de agulha

Para a aspiração folicular, em bovinos, podem ser utilizadas agulhas de 17 Gauge (G) e de 21G e comprimentos variados, descartáveis ou não (Viana et al., 2002) (Figura 5). Segundo este mesmo autor o calibre interno é a característica mais importante da agulha de punção, pois está diretamente relacionado à velocidade do fluxo do fluido, ao volume de espaço morto e a ocorrência de turbulência no sistema de aspiração.

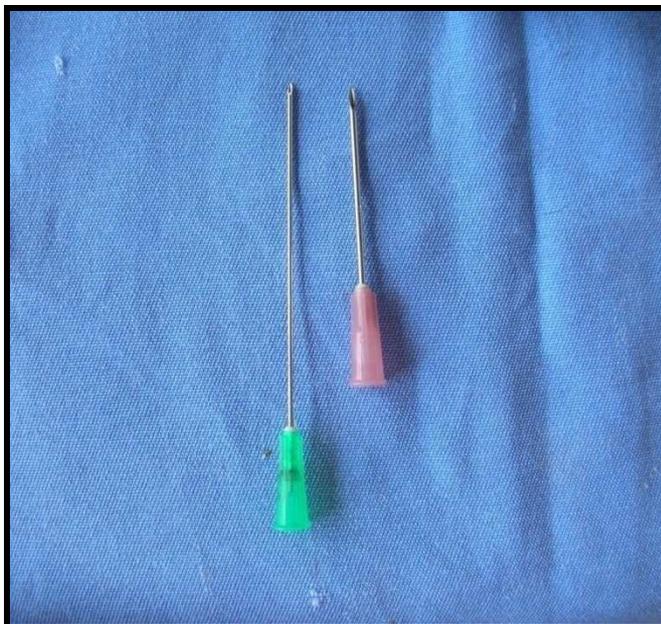


Figura 5. Tipos de agulhas utilizadas durante a aspiração folicular, 20G (bulbo verde) e 18G (bulbo rosa).

Calibres de agulhas menores que 21G e maiores que 17G não devem ser utilizados, pois impossibilitam colher complexo *cumulus oophorus* (CCOs) intactos ou

dificultam a aspiração de folículos de menor diâmetro (Hashimoto et al., 1999). As agulhas de maiores diâmetros (17 ou 18G) são mais rígidas e, portanto, menos sujeitas a entortar durante a manipulação do ovário (Fry et al., 1997).

De acordo com Seneda et al. (2002), as agulhas com diâmetros maiores de 18G relacionaram-se a maiores taxas de recuperação de oócitos, embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maiores danos ao estroma e maior quantidade de sangue no líquido aspirado. Já as agulhas de diâmetro menor que 19 G apresentaram índices reduzidos de recuperação de oócitos, possivelmente pela lentidão da aspiração do líquido folicular, no momento da punção. Agulhas de menor calibre estão menos sujeitas à variação na velocidade de fluido aspirado por minuto do que agulhas com calibre interno maior (Bols et al., 1996). Agulhas de menor diâmetro resultam na recuperação de maior percentual de CCOs de melhor qualidade e menor percentual de oócitos total ou parcialmente desnudos (Bols et al., 1996; Hashimoto, 1999). É possível que a explicação para estes resultados se dê devido ao fato do movimento dos fluidos em agulhas de menor diâmetro ser mais lento e laminar, resultando em menor turbulência (Horne et al., 1996). Já a utilização de agulhas maiores, mesmo aplicando menores pressões de vácuo, leva a diferenças na velocidade do fluxo entre o centro e a periferia do lúmen, gerando forças mecânicas sobre os CCOs (Viana et al., 2002).

No início a aspiração era realizada apenas com agulhas longas (55 cm), produzidas especificamente para aspiração folicular. Mais tarde, devido ao custo elevado e a necessidade de rápida substituição dessas agulhas, pois perdiam o gume rapidamente, o que prejudicava a recuperação dos oócitos, optou-se por utilizar agulhas hipodérmicas descartáveis (Seneda et al., 2002).

O tamanho do bisel da agulha é outro aspecto a ser considerado para aspiração folicular. Bols et al. (1996) realizaram um experimento que testava o efeito de pressões de vácuo de 50, 70, 90, 110 e 130 mmHg, em agulha de 20G com bisel curto ou longo. Estes autores observaram que as agulhas de bisel longo promoveram maiores taxas de recuperação quando se utilizou a mesma pressão de vácuo, descartando, assim, a hipótese inicial de que agulhas de bisel curto promoveriam melhores resultados. A melhor explicação é de que no momento da perfuração da parede folicular, agulhas de bisel longo e mais afiadas ocasionam menor pressão intrafolicular, que reduz o risco de perda de fluido folicular entre a parede do folículo e a agulha (Horne et al., 1996).

Pressões de vácuo

Junto com a agulha, a escolha da pressão a vácuo para aspiração é fundamental para a melhor eficiência da técnica. Trabalhos indicam que pressões de 50 mmHg foram pouco eficientes para a aspiração, enquanto pressões maiores como 120 mmHg, danificaram o revestimento do *cumulus oophorus*, embora essa pressão dependa também de fatores como: comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo, diâmetro da agulha.

A relação diâmetro da agulha e pressão da bomba de vácuo deve ser tal que permita a recuperação oócitos com *cumulus oophorus* intacto, pois isso é importante para a maturação citoplasmática normal (Chian e Niwa, 1994). As maiores taxas de recuperação são observadas com agulhas mais grossas, porém, isso resulta em maior quantidade de oócitos desnudos. Em contrapartida, utilizando-se agulhas mais finas, a proporção de oócitos com *cumulus oophorus* intacto é maior, porém apresentam menores taxas de recuperação. Assim, Bols et al. (1996), recomendam o uso de agulhas finas com pressão a vácuo moderada para uma maior obtenção de oócitos morfológicamente melhores.

Dinâmica folicular

A fêmea bovina tem em seus ovários ao nascimento em torno de 150.000 folículos primordiais, reduzindo para 3.000 aos 20 anos (Bao e Garverck, 1998). Os oócitos podem ser considerados como as células mais raras existentes no organismo, pois além de seu estoque não ser renovável, em condições naturais, menos de 0,1% dos folículos chegam a ovular durante a vida da fêmea, enquanto o restante sofre atresia (Gosden, 1998).

O crescimento folicular ocorre em ondas, que irão variar de 2 e 3 vezes durante um ciclo estral completo (Santos e Amstalden, 1998). Nos ciclos estrais com duas ondas, a primeira inicia-se Dia 0 (estro) e a segunda no Dia 10, e no caso de três ondas de crescimento folicular, a primeira inicia-se no Dia 0 (estro), a segunda no Dia 9 e a terceira no Dia 16 (Ginther et al., 1989). O número de ondas foliculares pode estar relacionado com o escore corporal do animal (Weeb et al., 1999).

Após um aumento nas concentrações sanguíneas de FSH, ocorre uma nova onda de crescimento folicular, onde um grupo de folículos de 4 - 5 mm de diâmetro é recrutado e começam a se desenvolver (Adams, 1994). Dentre estes folículos apenas um deverá continuar crescendo e tornando-se dominante (7 a 9 mm de diâmetro), enquanto

os outros folículos rapidamente entram em atresia e regridem (Weeb et al., 1999). Para que ocorra a ovulação do folículo dominante, é necessário que aconteça a luteólise naturalmente ou através da aplicação de PGF_{2α} (Santos e Amstalden, 1998). Caso não ocorra, o próprio folículo dominante entrará em atresia, e, novamente, uma onda de crescimento folicular irá iniciar-se (Weeb et al., 1999). Sob o estímulo do FSH os folículos em crescimento passam a produzir estrógeno e inibina que diminuem a concentração de FSH na circulação. Se ocorrer uma diminuição nas concentrações sanguíneas de progesterona irá ocorrer à ovulação deste folículo dominante (Hafez e Hafez, 2004).

Após a ovulação o corpo lúteo é formado através da organização das células da granulosa e as células da teca. Quando há aumento nas concentrações periféricas de estrógenos secretados pelos folículos em desenvolvimento, estes estimulam indiretamente a produção de LH (hormônio luteinizante) pela hipófise anterior, iniciando a formação luteal. Devido ao aumento nas concentrações de LH as células da granulosa e células da teca iniciam a ovulação e a luteinização. Neste momento essas células substituem a síntese de estrógeno para progesterona, indispensável para a implantação e manutenção da gestação (Hafez e Hafez, 2004).

Tem sido analisada a dinâmica folicular na tentativa de se estabelecer relações que permitam melhor aproveitamento dos oócitos (Seneda et al., 2002). Bols et al. (1997) observaram que oócitos apresentavam diferentes capacidades de desenvolvimento, conforme a fase do ciclo estral em que foram colhidos. Pode-se obter oócitos de folículos de tamanhos heterogêneos, variando de 3 a 15 mm, após aspiração folicular, pois se encontram em diferentes níveis de maturação nuclear e citoplasmática. Todos esses folículos já são capazes de se desenvolver *in vitro* (Dieleman et al., 2002), embora os folículos de 3 mm possam ainda não apresentar uma quantidade suficiente de RNA mensageiro e proteínas específicas para sustentar a fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Pavlock et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Krisher, 2004).

Alguns autores dedicaram-se ao estudo do efeito do tamanho e da fase de crescimento folicular na produção de embriões *in vitro* e concluíram que oócitos provenientes de folículos maiores se desenvolvem melhor *in vitro*, pois observaram aumento na produção de embriões de oócitos aspirados de folículos médios e grandes quando comparado a folículos pequenos (Pavlock et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Arlotto et al., 1996; Hagemann et al., 1999). Hendriksen et al. (2000) acreditam que este

efeito ocorra provavelmente devido a fase de dominância do ciclo estral, pois o folículo dominante afeta negativamente a competência oocitária dos folículos subordinados, induzindo avanço no estágio de atresia.

As relações entre dinâmica e atresia foliculares também têm sido estudadas, com relatos de presença de oócitos saudáveis em folículos claramente atrésicos (Kruip e Dileman, 1982; Blondin e Sirard, 1995). Para Wurth e Kruip (1992), um leve grau de atresia folicular parece ter um efeito benéfico no oócito destinado para a FIV. Para estes autores, o efeito inibitório da maturação do oócito seria mais eficaz, estando a parede folicular perfeitamente íntegra, enquanto o folículo levemente atrésico deixaria de exercer este efeito, favorecendo a maturação *in vitro*. Além disso, a competência do oócito seria adquirida tardiamente em relação ao desenvolvimento folicular (Blondin e Sirard, 1995), o que justificaria a assincronia entre desenvolvimento folicular e oocitário (Seneda et al., 2002).

Lonergan et al. (1994) observaram tanto em animais vivos como em ovários de matadouro menor recuperação de oócitos quando havia predomínio de grandes folículos no momento da aspiração. Os autores constataram taxas de recuperação maiores quando aspiravam folículos de 2 a 6 mm, comparando aos maiores de 6 mm. Apesar dos folículos maiores que 5 mm serem aspirados mais facilmente, para Bols et al. (1997), a aspiração de folículos pequenos parece disponibilizar maior número de oócitos para o cultivo. A explicação para relação inversa entre os folículos de maior diâmetro e da taxa de recuperação de oócitos tem sido justificada de diversas formas, como alterações morfológicas no CCO (Bols et al., 1998), viscosidade do fluido folicular (Goodhand et al., 1999), quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular (Seneda, 1999). Desta forma, um aspecto a ser considerado seria o momento da aspiração, em que predominassem folículos de menor diâmetro, conforme sugerido por Hashimoto et al. (1999).

Em um estudo realizado por Machatkova et al. (1996), onde foram comparadas as aspirações em diferentes estádios do ciclo estral, observou-se que oócitos aspirados nos dias 14 a 16 do ciclo apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento até blastocisto quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9. No entanto, Carolan et al. (1996) e Seneda et al. (2001) não observaram influência do diâmetro folicular sobre a competência do oócito, quando analisados oócitos aspirados de folículos pequenos ou grandes.

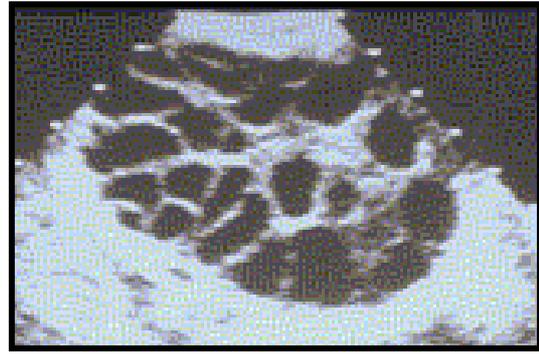
Folículos disponíveis para aspiração

Idade, linhagem, escore de condição corporal e a fase de crescimento folicular de vacas escolhidas ao acaso podem causar grandes variações na população folicular e no número de oócitos aspirados. Nas Figuras 8 a, b, c e d podem ser observados dois ovários de duas vacas da mesma idade, mesma dieta, escore de condição corporal semelhante e ambas com a onda de crescimento folicular sincronizada, entretanto, a quantidade de folículos presentes nos ovários de um animal (Figura 6 b, d) é menor que o outro (Figura 6 a, c).

O número de folículos da “reserva ovariana”, pode ser o responsável pela alta variabilidade no número de folículos recrutados por onda de desenvolvimento folicular, que causa uma grande diferença entre indivíduos (Erickson, 1966). Apesar disto, parece haver uma relação entre a reserva de folículos pré-antrais e o número de folículos se desenvolvendo em cada onda de crescimento folicular (Hirshfield, 1994), existindo ainda uma alta repetibilidade entre o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (Burns et al., 2005). De acordo com Boni et al. (1997), esta alta repetibilidade é independente do lado do ovário e não é ao acaso, mas é parte de um processo fisiológico bem organizado e estabelecido desde o nascimento do animal.



a)



b)



c)



d)

Figura 6. População folicular disponíveis para aspiração. Na figura a, b, c e d podem ser observada uma imagem ultrassonográfica e o ovário de vaca com baixa população folicular (a e c) e alta população folicular (b e d).

Sincronização da emergência da onda folicular

Já foi amplamente demonstrado que o uso de uma fonte de progesterona, associada à administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e origina uma nova onda folicular, revisto por Bó et al. (1995) e Bó et al. (2003).

A figura 7 mostra o mecanismo de sincronização da onda folicular. O estrógeno colocado junto com a progesterona suprime o crescimento folicular (Mapletoft et al., 2000) e induz a um novo crescimento sincronizado de uma onda de crescimento folicular cerca de 4 a 5 dias após a injeção do estrógeno (Bó et al., 1995).

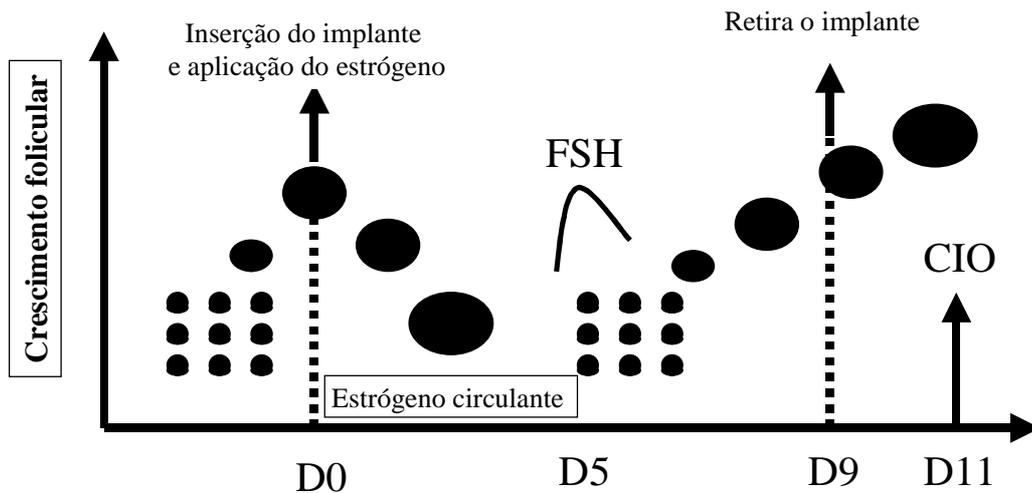


Figura 7. Mecanismo de ação do progestágeno na sincronização da emergência da onda de crescimento folicular.

Nonato Júnior et al. (2006) realizaram 51 sessões de aspiração em 8 doadoras Nelore, distribuídas em quatro grupos: Grupo CONTR (Controle; n=23; aspiração em dia aleatório do ciclo estral); Grupo ASPFD (Aspiração do folículo dominante 3 dias antes da aspiração; n=9); Grupo NORG (Inserção de implante auricular contendo Norgestomet, associado à administração de 2mg de benzoato de estradiol e a 50mg de progesterona injetável intramuscular). Os autores observaram que a inserção de implante à base de progestágenos associado ao tratamento com BE+P4 IM, previamente à aspiração folicular, aumenta o número de oócitos recuperados e o número de prenhez por aspiração. Bacelar et al. (2006) observaram que os animais que receberam 50 mg de progesterona sintética injetável, apresentaram um aumento ($p < 0,05$) no número de oócitos viáveis (7,3) quando comparado aos animais do grupo controle (5,4).

Superovulação prévia a aspiração folicular

A taxa de recuperação pode ser influenciada pelas terapias gonadotróficas (Pieterse et al., 1992; Meintjens et al., 1995), frequência de realização da técnica (Gibbons et al., 1994), fase do ciclo estral (Vos et al., 1994), pressão de vácuo e tipo de agulha (Bols et al., 1996), tamanho do folículo (Seneda et al., 2001), além da experiência do operador (Garcia et al., 1998). Considerando a possibilidade de alteração do diâmetro folicular pelos estímulos hormonais, a modificação nos protocolos de terapias gonadotróficas poderia contribuir neste sentido (Seneda et al., 2002).

Barros e Nogueira (2001) e Baruselli et al. (2006) propuseram tratamentos diversos para induzir ovulação múltipla (superovulação). Destacam-se entre os agentes superovulatórios testados a gonadotrofina coriônica equina (eCG) administrada isoladamente (Boland et al., 1991) ou associada a soro anti-eCG (Dieleman et al., 1987) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos ou equinos (Donaldson, 1989).

Guibault et al. (1991) relatam evidências de que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório pode diminuir a produção de embriões. Por isso, algumas estratégias foram desenvolvidas com o intuito de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos. Exemplos dessa estratégia são: começar a superestimulação com FSH no primeiro dia do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Roberts et al., 1994), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996) e sincronizar o início das ondas foliculares (Bó et al., 1995).

Merton et al. (2003) encontraram um efeito positivo da pré-estimulação ovariana antes da OPU na competência de desenvolvimento dos oócitos, quando utilizaram o FSH. Este esquema de superovulação varia em relação a quantidade a ser aplicada, número de aplicações realizadas e o intervalo entre a última aplicação de FSH e a aspiração. Segundo Merton et al. (2003) uma das possíveis explicações para a pré-estimulação ovariana com FSH seria um aumento no número de folículos médios e grandes, impedindo os mesmos de entrarem em atresia, o que poderia resultar em oócitos mais capacitados para sofrerem a maturação *in vitro*.

Já para outros autores os tratamentos com FSH poderiam induzir uma assincronia entre a maturação do oócito e seu ambiente folicular ou entre a maturação nuclear e a citoplasmática, que resulta em diminuição nas taxas de desenvolvimento. Outra desvantagem dos tratamentos superovulatórios, são as várias aplicações de FSH (Bousquet et al., 1995).

A eCG é uma substância que tem até 3 dias de meia vida, produzida nos cálices endometriais de éguas prenhes, no período de 40 a 130 dias de gestação. Ela se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo. Observaram-se em éguas receptoras, efeitos positivos em protocolos de transferência de embriões em tempo fixo, utilizando-se a eCG, devido ao aumento na taxa de aproveitamento das receptoras e indução da formação de um corpo lúteo que produz mais progesterona (Baruselli et al, 2008).

Baruselli et al. (2008) ainda afirma que as receptoras que recebem eCG durante o tratamento de sincronização apresentam melhor eficiência na transferência de embriões, devido a um aumento da taxa de ovulação e de aproveitamento, além de possuírem maiores níveis de progesterona circulante no diestro, minimizando falhas no reconhecimento da gestação.

Seneda, 2001 avaliou a ultraestrutura de oócitos recuperados de animais submetidos a estímulo gonadotrófico e, conseqüentemente, aspirados nos dias um (primeiro grupo) e no dia três (segundo grupo) pós-aplicação. Este autor pode evidenciar que, a zona pelúcida (ZP) apresentou-se bem caracterizada nos dois grupos, evidenciando que, sob este aspecto, folículos antrais de menor diâmetro (grupo aspirado um dia pós-aplicação) possuem oócitos semelhantes aos de folículos maiores (aspirados três dias pós-aplicação). No entanto, em oócitos do primeiro grupo notou-se a presença de microvilos e processos celulares da granulosa na ZP, achados compatíveis com a formação recente desta estrutura, enquanto no segundo grupo tais estruturas estavam ausentes (Seneda, 2001). Assim o autor pode concluir que os oócitos do segundo grupo encontravam-se num estágio de desenvolvimento discretamente mais adiantado em relação aos do primeiro grupo. Conforme descrição de Fleming e Saake (1972), o oócito aumenta sua atividade interna e diminui sua dependência das células da granulosa quando se aproxima o instante de retomar a meiose.

LITERATURA CITADA

- Adams, G.P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, 41: 19-24.
- Arlotto, T., J.L. Schwartz, N.L. First, M.L. Liebried-Rutledge. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocyte. *Theriogenology*, 45: 943-956.
- Bacelar, D., L.C. Padilha, P.S. Baruselli, et al. 2006. Incremento da obtenção de oócitos em vacas Nelore com utilização de um protocolo hormonal com progesterona injetável. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34: 461.
- Bao, B. and H.A. Garverck. 1998. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal Animal Science*, 1903-1921 p.
- Barros, C. and M. Nogueira. 2001. Embryo transfer in bos indicus cattle. *Theriogenology*, 56: 1483-1496.
- Baruselli, P.S., M. Sá Filho, C. Martins, L. Nasser, M.G.F. Nogueira, C.M. Barros, G.A. Bo. 2006. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
- Baruselli, P.S., C.M. Martins, J.N.S. Sales, R.M. Ferreira. 2008. Novos avanços na superovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36: 443-448.

- Bergfelt, D.R., K.C. Lightfoot and G.P. Adams. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42: 895-907.
- Blondin, P. and M.D. Sirard. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 54-62.
- Bó, G.A., G.P. Adams, M. Caccia, M. Martinez, et al. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39: 139-204.
- Bó, G.A., P.S. Baruselli and M.F. Martinez. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78: 307-326.
- Bodensteiner, K.J., K. Kot, M.C. Wiltbank, O.J. Ginther. 1996. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. *Theriogenology*, 45: 1115-1128.
- Boland, M.P., D. Goulding and J.F. Roche. 1991. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35: 5-17.
- Bols, P.E.J., J.M.M. Vandenheede, A. Van Soom, A. Kruif. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43: 677-687.
- Bols, P.E.J., A. Van Soom, M.T. Ysebaert, et al. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 1001-1014.
- Bols, P.E.J., T.M.T. Ysebaert, A. Van Soom, et al. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, 47: 1221-1236.
- Bols, P.E.J., M.T. Ysebaert, A. Lein, M. Coryn, A. Van Soom, A. Kruif, A. 1998. Effects of longterm treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in a OPU-IVF program. *Theriogenology*, 49: 983-995.
- Bols, P.E.J., J.L.M.R. Leroy e J.H.M. Viana. 2005. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33: 1-4.
- Boni, R., S. Roviello, B. Gasparrini, et al. 1997. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and in vitro embryo production in Italian buffalo cow. *In: Proceedings of 5th World Buffalo Congress*, 787-792.
- Bousquet, D., C. Milovanov, J.C. Bell, et al. 1995. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology*, 43: 172.
- Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Dona Vick, J.F. Evans, M.A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilizations in the cow. *Biol. Reprod.*, 27: 147-158.
- Burns, D.S., F. Jimenez-Krassel, J.L.H. Ireland, et al. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatedly in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, 73: 54-62.
- Carolan, C., P. Lonergan, P. Monget, et al. 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction Development*, 43: 477-483.
- Chian, R.C. and K. Niwa. 1994. Effect of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 176.

- Dieleman, S.J., M.M. Beuers, J. Gielen. 1987. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*, 27: 222.
- Dieleman, P.J.M., D.V. Hendriksen, P.D. Thomsen. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, 57: 5-20.
- Donaldson, L.E. 1989. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*, 31-183 p.
- Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal Animal Science*, 25: 800-811.
- Feichtinger, W. and P. Kemeter. 1986. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertility and Sterility*, 45: 722-725.
- Fleming, W.N. and R.G. Saake. 1972. Fine structure of the bovine oocyte from the mature Graafian follicle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47: 203-213.
- Fry, R.C., E.M. Niall, T.L. Simpson, et al. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 48: 977-987.
- Garcia, J.M., et al. 1998. In vitro production (IVP) of bovine embryos: different procedures. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, 26: 281.
- Gibbons, J.R., W.F. Beal, R.J. Krisher, et al. 1994. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42: 405-419.
- Ginther, O.J., L. Knopf and J.P. Kastelic. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *Journal Reproduction and Fertility*, 87: 223-230.
- Gonçalves, P.B.D., J.A. Visintin, M.A.L. Oliveira, M.M. Montagner, L.F.S. Costa. 2001. Produção *in vitro* de Embriões. Em: Gonçalves, P.B.D., J.R. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. Varela Editora e Livraria. São Paulo. 195-226 p.
- Goodhand, K.L., et al. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. *Theriogenology*, 51: 951-961.
- Gosden, R.G. 1998. Biology and technology of primordial follicle development. *In: Gametes development and function*. 71-83 p.
- Goulding, D., D.H. Willians, P. Duffy, M.P. Boland, J.F. Roche. 1990. Superovulation in heifers given FSH initiated either at Day 2 or at mid luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology*, 33: 239.
- Guilbault, L.A., F. Grasso, and J.G. Lussier. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal Reproduction Fertility*, 91: 81-89.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2004. *Reprodução Animal*. Manole, 7ª ed.
- Hagemann, L.J., S.E. Beaumont, M. Berg, et al. 1999. Development during IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction Development*, 53: 451-458.
- Hashimoto, S., R. Takakura, M. Kishi, T. Sudo, N. Minami, M. Yamada. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology*, 52: 131-138.
- Hendriksen, P.J.M., P.L.M.A. Vos, W.N.M. Steenweg, et al. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, 53: 11-20.

- Hirshfield, A.N. 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of Reproduction*, 50: 421-428.
- Horne, R., C.J. Bishop, G. Reeves, et al. 1996. Aspiration of oocyte for in vitro fertilization. *Human Reproduction Update*, 2: 77-85.
- Knopf, L., J.P. Kastelic, E. Schallenger, et al. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 6: 111-120.
- Krisner, R.L. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82: 14-23.
- Kruip, T.A.M. and S.J. Dieleman. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction, Nutrition and Development*, 22: 465-473.
- Kruip, A.M., R. Boni, Y.A. Wurth, M.W.M. Roelofs, M.C. Pieterse. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42: 675-684.
- Kurykin, J., L. Majas, A. Valdmann, H. Kuèbar, M. Aunapuu. 2000. Effect of repeated transvaginal ovarian puncture under rectal control on function of ovaries in cattle. In: *International Congress on Animal Reproduction*, 43 p.
- Leeuw, Van Wagtenonk-de. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*, 65: 914-925.
- Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M.P. Boland, I. Gordon. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction Development*, 37: 48-53.
- Machatkova, M., E. Jokesova, J. Petelíkova, et al. 1996. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 45: 801-810.
- Mapletoft, R.J., G.A. Bo e G.P. Adams. 2000. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. Em: *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 24-51 p.
- Meintjes, M., M.S. Bellow, J.R. Broussard, J.B. Paul, R.A. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone - treated pregnant beef for in vitro fertilization. *Journal of Animal Science*, 73: 967-974.
- Merton, J.S., A.P.W. Roos, E. Mullaart, et al. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674.
- Nibart, M., M.S. Peixer, J.M. Thuard, M. Durant, C. Guyader-Joly, S. Ponchon, B.M. Guienne, P. Humblot. 1995. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. Em: *Réunion A.E.T.E*, 216 p.
- Nonato Junior, I., J.H.F. Pontes, J.R. Ereno, et al. 2006. Utilização de progesterona exógena em protocolos de opu de vacas Nelore - resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34: 452.
- Pavlock, A., Lucans-Hahn, H. Niemann. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 31: 63-67.
- Petyim, S., R. Baêge, M. Forsberg, H. Rodriâ-Guez-Martiânez, B. Larsson. 2001. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *Journal of the Veterinary Medical Association*, 48: 449-463.

- Pieterse, M.C., et al. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Pieterse, M.C., et al. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35: 19-24.
- Pieterse, M.C., P.L.A.M. Vos, T.A.M. Kruip, Y.A. Wurth, T.H. Van Beneden, A.H. Willense, M.A. Taverne. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG treated cows. *Theriogenology*, 37: 273.
- Reichenbach, H.D., M.A.L. Oliveira, P.F. Lima, et al. 2002. Transferência e criopreservação de embrião bovino. Em: Gonçalves, P.B.D., J.R. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Biotécnicas aplicada à reprodução animal. Varela Editora e Livraria. São Paulo. 127-178 p.
- Roberts, A.J., J.M. Grizzle and S.E. Echtenkamp. 1994. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, 42: 917-929.
- Rodrigues, C.F.M. e J.M. Garcia. 2000. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, 28: 186-187.
- Santos, J.E. e M. Amstalden. 1998. Effects of nutrition on bovine reproduction. In: *Anais dos Arquivos da Sociedade Brasileira de Veterinária*, 26: 19-89.
- Sauvé, R. 1998. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. In: *Anais da XIII Reunião Annual da SBTE*, 26: 141-145.
- Seneda, M.M. 1999. Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia: efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do oócito para o desenvolvimento *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Universidade Estadual Paulista.
- Seneda, M.M., C.S. Esper, J.M. Garcia, et al. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 67: 37-43.
- Seneda, M.M., C.R. Esper, J.M. Garcia, et al. 2002. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Seminário: Ciências Agrárias*, 23: 101-110.
- Seneda, M.M., K.C.P. Rubin, W. Blaschi, L.A. Lisboa, J.H.F. Pontes. 2005. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para a aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. *Revista de educação continuada do CRMV-SP*, 8: 168-175.
- Viana, J.H.M., L.S.A. Camargo, A.M. Ferreira, et al. 2002. Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology*, 57: 630.
- Viana, J.H.M., A.A. Nascimento, N.L. Pinheiro, et al. 2003. Caracterização de seqüelas subseqüentes a punção folicular em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 23: 119-124.
- Viana, J.H.M. e P.E.J. Bols. 2005. Variáveis biológicas associadas à recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33: 1-4.
- Viana, J.H.M. e L.S.A. Camargo. 2007. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35: 915-919.
- Vos, P.L.A.M., et al. 1994. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. *Theriogenology*, 41: 829-840.
- Weeb, R., R.G. Gosden, E.E. Telfer, et al. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science*, 68: 257-284.

Wurth, U.A. and T.A.M. Kruip. 1992. Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In: Internation Congress on Animal Reproduction, 1: 379-387.

RESUMO

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE VACAS NELORE ESTIMULADAS COM FSH OU eCG

Avaliou-se a produção de oócitos e embriões produzidos *in vitro* de 42 vacas, mestiça Nelore proveniente de grupo genético homogêneo, com idade de 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg, estimuladas com FSH ou eCG. Estas foram distribuídas em três grupos: Grupo 1 = Controle (n=14), apenas OPU, Grupo 2 = tratadas com 1400 UI de eCG, em dose única seguida de OPU (n=14); e, Grupo 3 = tratadas com 120 UI de FSH, administrados com intervalo de 12 horas em quatro doses seguida de OPU (n=14). Todos os grupos receberam implante auricular contendo 3 mg de Norgestomet no primeiro dia (D0) associado a administração de 2 mg de benzoato de estradiol via intramuscular. No sétimo dia (D7) foram retirados todos os implantes e na sequência foram realizadas as aspirações ovarianas das vacas do grupo 1. O grupo 2 recebeu a aplicação de eCG no quinto dia e a OPU foi realizada no D7. Já o grupo 3 recebeu o tratamento com FSH no quinto e sexto dia, e foram aspiradas em D7. O procedimento de aspiração folicular foi realizado via transvaginal guiada por ultrassom. Foram realizadas 42 aspirações com obtenção de 627 oócitos, sendo 502 viáveis e 125 inviáveis. Realizou-se a maturação e fecundação *in vitro*. Avaliaram-se as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão. Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nos parâmetros avaliados entre os grupos. Conclui-se que o estímulo ovariano com FSH ou com eCG nas doses utilizadas, foram insuficientes para incrementar o número e a qualidade de oócitos viáveis submetidos a fertilização *in vitro* para produção de embriões.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: OPU. FIV. Reprodução animal.

SUMMARY

OOCYTES ASPIRATION AND *IN VITRO* EMBRYOUS PRODUCTION FROM NELLORE COWS STIMULETED WITH FSH OR eCG

It was evaluated the oocyte and embryos *in vitro* production of 42 Nellore mixed breed cows come from de same genetic group, aging from 4 to 9 years, with mean body weight of 420 kg, stimulated with FSH and eCG. The animals were distributed into three groups: group 1 = control (n= 14), only with OPU; group 2 = treated with 1400 UI of eCG in a single dose plus OPU (n=14); and group 3 = treated with 120 UI of FSH administered four times plus OPU with 12h of interval (n=14). All groups received auricular implant with 3 mg of Norgestomet on the first Day (D0) associated with 2 mg of stradiol benzoate intramuscularly. At the seventh day (D7) the implants were removed and the ovarian aspirations were realized on the cows of group 1(OPU). Group 2 had the eCG applied at the fifth Day and the OPU was performed at D7. The animals from group 3 were treated with FSH at fifth and sixth day and the aspiration occurred at D7 (OPU). The follicular aspiration procedure was done via transvaginal guided with ultrasound. It was performed 42 aspirations obtaining 627 oocytes, where 502 were viable and 125 non-viable. Then, it was realized the *in vitro* maturation and fecundation. The cleavage, blastocyst and eclosion rate were evaluated. There were no significant difference ($p>0,05$) at these parameters between the groups. In conclusion, the gonodotrophic stimulation with FSH and eCG, at the doses used in this study, was insufficient to increase the quality of the viable oocytes submitted to *in vitro* fertilization to produce embryos.

ADDITIONAL KEYWORDS: OPU. FIV. Animal reproduction.

INTRODUÇÃO

A utilização de fármacos na reprodução animal assistida teve significativos progressos na última década, de modo que, atualmente, alguns ainda vêm sendo intensamente testados e diversos outros já são utilizados rotineiramente. Utilizando-se a hormonioterapia é possível incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e de leite, visando o tratamento de afecções ovarianas ou nos programas de inseminação artificial e superestimulação ovariana em animais de elevado valor genético (Kozicki et al., 2005).

A biotecnologia reprodutiva tem sido utilizada para acelerar e aprimorar a genética de rebanhos, favorecendo difusão de genes de animais com alto valor zootécnico e comercial. O sucesso da transferência de embriões (TE) e da fertilização *in vitro* (FIV) depende, em grande parte, da resposta à superovulação. Nos atuais programas comerciais de TE, a resposta de doadoras submetidas à superovulação se caracteriza por uma alta variação nas taxas de ovulação e fecundação, o que leva a resultados não tão previsíveis e nem confiáveis na produção de embriões (Boland et al., 1991). A variabilidade na produção de embriões pode ser influenciada por fatores relacionados com o tratamento superovulatório, mas em maior grau por fatores individuais associados às características da dinâmica folicular ovariana (Bó et al., 1995; Bó et al., 2000) ou a condição ovariana no momento da superovulação (Monniaux et al., 1983). Técnicas como maturação, fecundação e cultivo *in vitro* estão sendo utilizadas com o intuito de aumentar o uso de oócitos presentes nos ovários dos animais potencialmente doadores.

Entre as técnicas utilizadas para a coleta de oócitos, a aspiração transvaginal guiada por ultrassom é a que apresenta maior número de embriões produzidos *in vitro*

por doadoras devido a alta repetibilidade, possibilitando maior recuperação de oócitos (Pieterse et al., 1988).

Para Brogliatti & Adams (1996), a superestimulação hormonal aumenta o número de folículos de tamanho adequado para a aspiração e, conseqüentemente, o número de embriões que podem ser produzidos, devido a maiores taxas de recuperação, porém outros autores utilizando os mesmos tratamentos encontraram respostas diferentes.

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* e, conseqüentemente, melhorar a capacidade a partir de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Estudos da regulação da maturação de oócitos são essenciais para a geração de conhecimentos necessários para o aumento dos índices de produção de embriões *in vitro*.

Hoje a aspiração folicular (OPU), no Brasil, tem sido utilizada com sucesso por instituições dedicadas a pesquisa, assim como pela iniciativa privada na recuperação de oócitos para produção *in vitro* de embriões bovinos.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar oócitos de doadoras Nelore mestiças, verificando o efeito do tratamento estimulatório com FSH ou eCG sobre a taxa de recuperação, a produção e a qualidade morfológica de oócitos colhidos por aspiração folicular por via transvaginal, orientada pela ultrassonografia e, a subseqüente produção *in vitro* (PIV) de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi desenvolvido na Fazenda do CESUMAR (Centro de Ensino Superior de Maringá), no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – BIOTEC, que dispõe de laboratório de produção *in vitro* de embriões, localizada no município de Maringá – PR.

Animais e tratamentos

Foram utilizadas 42 fêmeas Nelore mestiças, proveniente de um mesmo grupo genético, com idade de 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg. Estas fêmeas foram everminadas com Ivermectina 1% (Ivomec, Merial®) e passaram por um período de adaptação de 45 dias, permaneceram em pastagem de *Cynodon* spp. (grama estrela) e tiveram acesso à água e sal mineral *Ad libitum*.

Todos os animais receberam implante auricular, substância contendo 3 mg de Norgestomet no dia 0 (D0) (Crestar, Intervet, Bosmeer, Holanda), associado a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) (Cronibest, Biogenesis, Bagó, Curitiba, Paraná), via intramuscular.

As fêmeas foram separadas aleatoriamente, em três grupos de 14 animais: Grupo 1: controle – não receberam tratamento estimulatório, apenas OPU; Grupo 2: estimulação com 1400 UI de gonodotrofina coriônica equina (eCG), (Folligon®, Intervet), via intramuscular, seguida de OPU; e Grupo 3: estimulação com 120 UI de hormônio folículo estimulante (FSH) (Pluset®, I.F. Serono, Roma, Itália), administrados via intramuscular em 4 aplicações com 12 horas de intervalo (30 UI), iniciando a partir do quinto dia da colocação do implante auricular, seguida de OPU.

Os implantes foram retirados em sete dias, em todos os animais e, em seguida foi realizada uma aspiração nos animais de cada grupo, totalizando 42 OPU. O detalhamento do esquema de hormonioterapia dos grupos 1, 2 e 3 estão detalhados na **figura 1**.

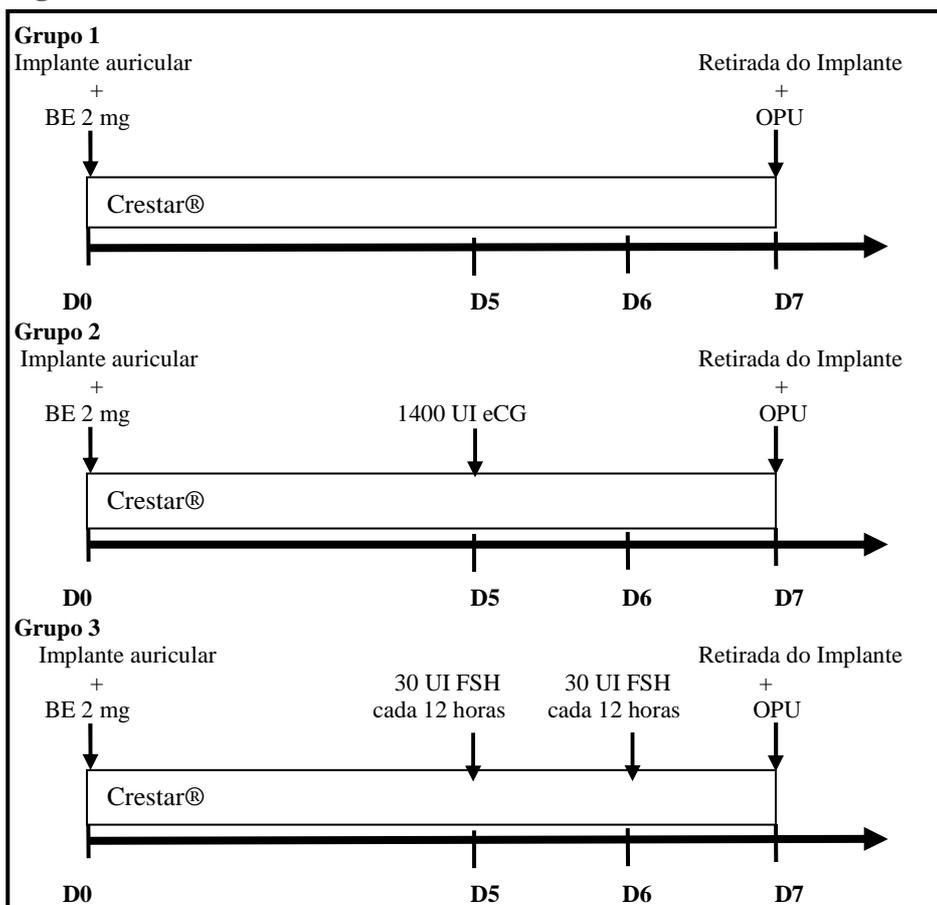


Figura 1 - Diagrama esquemático dos protocolos de estimulação e sincronização de ondas foliculares de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado com ultrassom Aloka SSD-500, acoplado a um transdutor microconvexo de 5 MHz (UST 974-5), sendo que o mesmo foi adaptado a uma guia de aspiração específica para o sistema reprodutor de bovinos. Uma agulha 20 G (WTA®) foi conectada ao sistema de aspiração (Cook VBOA 18L) com tubo Falcon de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba Cook V-MAR 5000, ajustada para 38 a 45 mmHg, permitindo um fluxo de 12 mL de meio/minuto.

Para inibir os movimentos peristálticos e desconforto ao animal foi feita uma anestesia epidural sacrococcígea, utilizando-se 100 mg de Lidocaína a 2% (Anestésico Pearson®) e, em seguida, o transdutor foi inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visualização dos folículos na tela do ultrassom.

Os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da linha de punção indicada na tela do ultrassom e quando se aproximou a agulha do folículo a ser aspirado, foi pressionado o pedal da bomba de vácuo e o oócito aspirado, procedimento repetido em todos os folículos acima de 3 mm de cada ovário. O meio utilizado para a aspiração, lavagem da agulha e do tubo Falcon receptor dos oócitos foi composto por uma solução de: 2,0 % de soro fetal bovino (Nutricell), 98,0 % de DMPBS-FLUSH (Nutricell) e 25 UI/ mL de heparina sódica (Liquemine®), evitando a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração.

Lavagem e seleção dos oócitos

O material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões (EmCom®) e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de *Petri* e efetuado a busca e contagem dos oócitos com posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram quantificados e classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em qualidade 1, 2 e 3 (*cumulus* completo, parcial ou expandido, respectivamente), oócitos sem *cumulus* (s/c) ou desnudos, expandidos (exp), degenerados (deg) ou atrésicos (atr), conforme descrito por Gonçalves et al. (2001). Os oócitos considerados viáveis, qualidade 1, 2 e 3, foram lavados em solução comercial de MIV-T (Nutricell) e transportados para o laboratório, em criotubos (Corning®), contendo meio de maturação em banho-maria a 35°C.

Maturação in vitro

No laboratório os oócitos foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 , suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 $\mu\text{g/mL}$ piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 0,5 μg de FSH/mL, 50 μg de LH/mL e 1 μg de estradiol/mL, mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar com máxima umidade, durante 22-24 horas. Durante esse período os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) permaneceram em microgotas de 100 μL de meio de maturação coberta por óleo mineral.

Fecundação in vitro

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em 100 μL de meio TALP-FIV suplementado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, 22 $\mu\text{L/mL}$ de piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 μM de penicilina, 1 μM de hipotaurina e 0,25 μM de epinefrina). O sêmen utilizado foi de uma mesma partida de um touro da raça Nelore, descongelado em banho-maria a 35°C. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizado centrifugação em gradiente percoll 90% e 45%, a 1200 rotações por minuto, durante 20 minutos. Foi utilizada a concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL e estes foram transferidos para microgotas com 20 oócitos/gota juntamente com COCs, onde permaneceram por 18 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO_2 em ar.

Cultivo in vitro

Realizada a etapa de fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro* no meio SOF suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 18 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 5% de CO_2 , em ar com máxima umidade. Decorridas 48 horas, foi avaliado a taxa de clivagem e feito a renovação do meio de cultivo. Sete dias após a fecundação foram realizadas as avaliações dos embriões de cada grupo, classificando-os de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido ou blastocisto eclodido, utilizando para tal, a classificação dos embriões recomendada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Análise Estatística

Os dados foram analisados no software SAS Versão 8. A diferença entre os grupos no número de oócitos viáveis, inviáveis, clivados, embriões ou embriões eclodidos foram analisados por análise de variância (PROC GLM) e as diferenças entre médias pelo teste Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa de obtenção de oócitos de vacas estimuladas com eCG ou FSH ou não estimuladas e produção de embriões *in vitro*, foram realizadas 42 aspirações foliculares (OPU) com a obtenção de 627 oócitos, sendo 502 viáveis e 125 inviáveis.

Na **tabela I**, estão descritos os resultados da aplicação do eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a qualidade dos oócitos viáveis de vacas.

Tabela I. Resultados médios da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a qualidade dos oócitos viáveis de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade. (Average result of eCG (equine chorionic gonadotropin) or FSH (follicle stimulating hormone) application on the quality of viable oocytes from Nelore crossbred cows from 4 to 9 years of age).

Parâmetro de variáveis	Tratamentos ¹		
	Controle	eCG (1400 UI)	FSH (120 UI)
Oócitos Viáveis	10,50 ± 11,56	16,38 ± 15,21	10,35 ± 7,27
Oócitos Qualidade 1	2,00 ± 3,96	5,46 ± 9,00	3,00 ± 3,74
Oócitos Qualidade 2	1,07 ± 1,59	2,00 ± 4,16	2,07 ± 2,05
Oócitos Qualidade 3	5,71 ± 8,58	5,15 ± 4,91	2,00 ± 2,07
Oócitos Expandidos	1,71 ± 2,26	3,77 ± 3,58	3,07 ± 4,68

¹ Valores não significativos pelo teste de Tukey a 5%.

Observou-se que não houve efeito ($p > 0,05$), dos tratamentos com eCG ou FSH no número de oócitos viáveis com relação ao grupo controle. O número de oócitos viáveis é de importância fundamental em programas de fertilização *in vitro* (FIV), pois está relacionado ao número de folículos presentes nos ovários no momento da aspiração folicular. O fato de não haver diferença significativa entre as quantidades de oócitos morfológicamente viáveis, pode indicar que a sincronização da onda folicular permitiu que todos os oócitos estivessem na mesma fase fisiológica, não havendo diferença entre os estimulados ou não.

Na **tabela II**, está expresso os resultados da aplicação do eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção de oócitos inviáveis de vacas Nelore mestiças.

Tabela II. Resultados médios da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção de oócitos inviáveis de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos. (Average result of eCG (equine chorionic gonadotropin) or FSH (follicle stimulating hormone) application on the production of viable oocytes from Nelore crossbred cows from 4 to 9 years).

Parâmetros de variáveis	Tratamentos ¹		
	Controle	eCG (1400 UI)	FSH (120 UI)
Oócitos Inviáveis	2,57 ± 5,54	2,38 ± 3,50	1,21 ± 3,11
Oócitos Atrésicos	1,71 ± 4,74	4,61 ± 6,45	1,00 ± 2,66
Oócitos Degenerado	0,85 ± 1,40	0,30 ± 0,63	0,14 ± 0,53
Oócitos Desnudo	0,21 ± 0,58	0,38 ± 0,76	0,07 ± 0,26

¹ Valores não significativos pelo teste de Tukey a 5%

Na última década, devido a constante necessidade de obtenção de oócitos de boa qualidade, uma importante meta dos pesquisadores que trabalham com OPU é a otimização da produção de oócitos. Para isso devemos utilizar técnicas de superestimulação ovulatória com agentes indutores de superovulação. Há considerável variação nos protocolos de estímulo hormonal que precedem a aspiração folicular relatados na literatura (Abdul et al., 1989; Bordignon et al., 1996; Puelker et al., 1999; Roover et al., 2005; Satrapa et al., 2005; Bó et al., 2008). No entanto, a escolha ficará a critério do técnico e dependerá da situação que melhor se adapte as necessidades da propriedade.

Os tratamentos superovulatórios disponíveis no mercado apresentam resultados com grande variação. Essa variedade de respostas tem origens múltiplas e ainda pouco compreendidas, mas parece estar relacionadas a fatores como aspectos genéticos (raças), fisiológicos (idade, condição ovariana), nutricionais, sanitários ou patológicos. Isso torna impossível a previsão de número de embriões que serão recuperados de cada animal. Além desses fatores descritos, fatores como a escolha do hormônio utilizado, assim como a dose, via e forma de aplicação, estação do ano, manejo na propriedade, também são responsáveis por variações nos resultados (Kafi & Mc Gowan, 1997; Baruselli et al., 2008; Bó et al., 2008).

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) apresenta custo mais baixo e pode ser facilmente encontrada no mercado, além de exigir aplicação em dose única, o que facilita o manejo dos animais. Já o FSH (hormônio folículo estimulante - extrato parcialmente purificado de hipófise de origem suína, ovina ou equina) trata-se de um

produto de custo elevado e, devido a curta meia-vida, requer várias aplicações por dose (Barros & Nogueira, 2001; Baruselli et al., 2006).

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, sendo testado o uso de diferentes concentrações (Pawlyshyn et al., 1986; Gonzalez et al., 1990; Saunders et al., 1990; Fonseca et al., 2001; Prado, 2006), vias de administração (Hockley et al., 1992; Tribulo et al., 1993) e a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (Donaldson, 1989; Tribulo et al., 1993).

Neste trabalho utilizou-se a pré-estimulação com FSH ou eCG, após sincronização das ondas foliculares com implante auricular de Norgestomet e aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol, com intuito de minimizar o efeito de algum folículo dominante (Bó et al., 1995), que resultou em uma média de $10,35 \pm 7,27$ oócitos viáveis com FSH, de $16,38 \pm 15,21$, com eCG e de $10,50 \pm 11,56$ no grupo controle. As diferenças nos resultados encontrados neste trabalho não foram significativas ($p > 0,05$).

Sendag et al. (2008) encontraram melhores resultados utilizando 500 UI de FSH comparando com a aplicação de 3000UI de eCG, em vacas holandesas. No trabalho os autores sugerem que a resposta ovariana, o número de folículo nos ovários e número oócitos, além de sua qualidade são afetados pelo tipo de gonadotrofina aplicada, sendo o FSH a melhor alternativa para OPU em relação ao eCG. Merton et al. (2003) também encontraram um efeito positivo na pré-estimulação ovariana com FSH, antes da OPU e, em relação a competência de desenvolvimento dos oócitos. O esquema de superovulação varia em relação à quantidade a ser aplicada, o número de aplicações realizadas e o intervalo entre a última aplicação de FSH e a aspiração. Nibart et al. (1997) indicam que a recuperação de oócitos viáveis pode dobrar com a utilização da superestimulação com FSH. Uma das possíveis explicações para o bom resultado da pré-estimulação ovariana com FSH seria um aumento no número de folículos médios e grandes, impedindo os mesmos de entrarem em atresia, isto poderia resultar em oócitos mais capacitados para sofrerem a maturação *in vitro*. Stubbings & Walton (1995) relatam que o pré-tratamento com FSH resulta numa resposta ovariana imediata, produzindo um maior número de folículos para aspiração na primeira semana de tratamento, comparando com animais não estimulados hormonalmente.

Rouillier et al. (1996); Goodhand et al. (1999); Roover et al. (2005) comentam que o tratamento com FSH supera os resultados obtidos nos tratamento como eCG , sendo para estes autores o método de escolha para superovulação de bovinos. Na

maioria dos estudos comparando os dois procedimentos, o tratamento com FSH resultou em leve aumento de número de embriões utilizáveis.

Wang et al. (1988) relataram que o número total de oócitos aumenta com a utilização de eCG, mas o número e percentual de clivagem diminui com altas doses de eCG. Entretanto, esses efeitos negativos não foram observados com doses crescentes de um extrato de pituitária suína altamente purificada (FSH) (Abdul et al., 1989). A dose total de eCG e a sua origem ou método de purificação, são fatores que podem ter contribuído para essas diferenças. Pieterse et al. (1992) utilizando um tratamento com eCG em 10 vacas, obtiveram resultados positivos em comparação aos animais não tratados.

Na **tabela III**, está descrito os resultados médios da aplicação do eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos aspirados de vacas Nelore mestiças.

Tabela III. Resultado médio e desvio padrão da aplicação da eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre a produção *in vitro* de embriões obtidos de aspiração de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade. (Average results and standard deviation of eCG (equine chorionic gonadotropin) or FSH (follicle stimulating hormone) application on the *in vitro* production of embryos obtained from aspiration of Nelore crossbred cows).

Parâmetros	Tratamentos ¹		
	Controle	eCG	FSH
Número médio de oócitos enviados a PIV	10,50 ± 11,56	16,38 ± 15,21	10,35 ± 7,27
Taxa de clivagem (%)	72,57 ± 33,80	72,73 ± 28,08	63,35 ± 37,29
Taxa de blastocisto (%)	37,50 ± 25,88	36,46 ± 24,37	38,57 ± 31,63
Taxa de eclosão (%)	28,07 ± 24,66	27,92 ± 25,43	24,58 ± 27,61

¹ Valores não significativos pelo teste de Tukey a 5%

Ramos et al. (2006) avaliaram os efeitos de dois protocolos de punção folicular na quantidade/qualidade dos oócitos e na produção de embriões *in vitro*, em vacas da raça Gir, não lactantes, sendo um grupo sem estimulação hormonal e outro com aplicação de 250 UI de FSH em doses decrescentes. Encontraram taxa de clivagem de 56% e de blastocisto de 18%, tendo a pré-estimulação ovariana melhorado a qualidade e a taxa de clivagem dos oócitos recuperados por punção folicular. Goodhand et al. (1996) verificaram que o FSH em doses múltiplas e aspiração de animais estimulados uma vez por semana têm sido mais eficientes que uma só administração. Entretanto Monteiro et al. (2009) utilizaram vacas controle, pré-estimuladas com FSH e OPU 6 horas após e,

pré-estimuladas com FSH e OPU 48 após, não tendo ocorrido qualquer diferença. As taxas de clivagem e de blastocisto foram semelhantes entre os três tratamentos, sendo 77,4% e 42,70%, 75,54% e 31,65%, 63,52% e 33,33%, respectivamente, contudo a taxa de blastocistos eclodidos foi superior nos controles (30,27%) em relação aos demais. No trabalho em questão obteve-se resultado semelhante comparando o Grupo Controle (sem estimulação) e o Grupo 3 (tratado com FSH), já que as taxas de clivagem, de blastocisto e de eclosão de todos os grupos foram semelhantes. Satrapa et al. (2005) notaram que a superestimulação ovariana com OPU 48 horas após a última aplicação de FSH não aumentou a produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Nelore, além de as maiores taxas de blastocisto eclodido foram observadas em oócitos provenientes de vacas que não foram superestimuladas. Já, Nonato et al. (2005) observaram que a administração prévia de FSH na aspiração folicular não aumentou a média de oócitos obtidos, porém, aumentou a taxa de produção embrionária, o que é benéfico para a tecnologia de produção de embriões *in vitro*, discordando dos resultados encontrados no trabalho aqui desenvolvido.

Chaubal et al. (2007) administraram FSH em dose única e múltiplas na estimulação ovariana antes da OPU e, notaram que a administração de FSH em três aplicações no período de 24 horas aumentou, significativamente, a resposta folicular e a recuperação de oócitos em vacas.

De Roover et al. (2008) afirmou que os resultados de sete anos de superestimulação ovariana com FSH antes da OPU, não ter melhorado a produção de embriões, mas os oócitos aspirados de vacas superestimuladas apresentaram melhor qualidade.

No presente trabalho foi observada elevada variação na quantidade de oócitos, de que no Controle foi de 1 a 43, nos pré-estimulados com FSH de 2 a 27 e nos pré-estimulados com eCG de 2 a 49, o que evidencia diferenças no potencial de vacas utilizadas como doadoras de oócitos. Tal fato torna necessária a avaliação prévia do animal antes de sua utilização em programas comerciais de produção de embriões *in vitro* e as razões para essa variabilidade ainda são pouco compreendidas (Ramos, 2006).

Considerando as informações conclui-se que pesquisas de ordem técnica e biológica poderiam contribuir para o incremento da OPU, aumentando a eficiência do procedimento e disponibilizando mais oócitos para os procedimentos de produção *in vitro* de embriões.

O resultado na recuperação de oócitos após aspiração folicular está condicionado a fatores ainda não totalmente compreendidos, portanto há interesse em realizar estudos tendendo a encontrar condições ótimas para cada situação.

CONCLUSÕES

O estímulo ovariano com 120 UI de FSH por animal ou com 1400 UI de eCG foi insuficiente para incrementar o número e a qualidade de oócitos viáveis na aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, não resultando em melhoria na produção de embriões *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul, S.S., J.S.M. Hutchinson, P.J. Broadbent, D.F. Dolman. 1989. Hormonal profiles in superovulated Hereford X British Friesian heifers. *Theriogenology*, 31: 253.
- Barros, C. and M. Nogueira. 2001. Embryo transfer in *Bos indicus* Cattle. *Theriogenology*, 56: 1483-1496.
- Baruselli, P.S., C.M. Martins, J.N.S. Sales, R.M. Ferreira. 2008. Novos avanços na superovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36: 443-448.
- Baruselli, P.S., M. Sá Filho, C. Martins, L. Nasser, M.G.F. Nogueira, C.M. Barros, G.A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
- Bó, G.A., D.C. Guerrero and R.J. Mapletoft. 2008. New approaches for manipulating follicular dynamics for superstimulation in cattle. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36: 397-408.
- Bó, G.A., G.P. Adams, M. Caccia, M. Martinez, R.A. Pierson, R.J. Mapletoft. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39: 139-204.
- Boland, M.P., D. Goulding, J.F. Roche. 1991. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35: 5-17.
- Bordignon, V., N. Morin, J. Durocher, D. Bousquet, L.C. Smith. 1996. Effect of GnRH injection on recovery rate, meiotic synchronization and developmental competence of oocytes aspirated from superstimulated heifers. *Theriogenology*, 45: 352.
- Brogliatti, G.M. and G.P. Adams. 1996. Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45: 1163.
- Chaubal, S.A., L.B. Ferre, J.A. Molina, D.C. Faber, P.E.J. Bols, P. Rezamand, X. Tian, X. Yang. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, 67: 719-728.
- De Roover, R., J.M. Feugang, P.E. Bols, G. Genicot, C.H. Hanzen. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryoproduction. *Reproduction Domestic Animal*, 43: 239-245.
- Donaldson, L.E. 1989. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*, 31: 183.

- Fonseca, J.F., J.M. Silva Filho, A. Pinto Neto, M.S. Palhares. 2001. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53: 671-676.
- Goodhand, K.L. R.G. Watt, M.E. Staines, J.S. Hutchinson, P.J. Broadbent. 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, 51: 951-961.
- Goodhand, K.L. P.J. Broadbent, R. Hutchinson, G. Watt. 1996. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. *Theriogenology*, 45: 355.
- Gonzalez, A., J.G. Lussier, T.D. Carruthers, B.D. Murphy, R.J. Mapletoft. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, 33: 519.
- Hockley, D.K, G.A. Bó, A.T. Palasz, M.R. Del Carmo, R.J. Mapletoft. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*, 37: 224
- Kafi, M. and M.R. McGowan. 1997. Factors associate with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*. 48: 137-157.
- Kozicki, L.E., M.S. Segui, J.C. Fantini Filho, F.R.A. Prado, F. Matté, J.R.P. Glaser, R.R. Weiss. 2005. A somatotrofina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. *Archives of Veterinary Science*, 10: 35-44.
- Madureira, E.H e P.S. Baruselli. 2000. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. Em: Bó, G. A., G.P. Adams e R.J. Mapletoft. Dinâmica folicular ovárica em bovino. Funvet. São Paulo. p.12-34.
- Merton, J.S., A.P.W. De Roos, E. Mullaart, et al. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-667.
- Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Monteiro, F.M, M.M.G. Ferreira, J.R. Potiens, B.G. Eberhardt, L.A. Trinca, C.M. Barros. 2009. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of Nellore (*Bos indicus*) embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 44. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/122299747/abstract#relatedArticles>. Acessado em 01/05/2009.
- Nibart, M., B. Marquant and P. Humblot. 1995. The application of new reproductive technologies in France. *Arquivo Faculdade Veterinária*, 25: 21-35.
- Nonato Jr, I., J.H.F. Pontes, J.C. Ereno Jr, B.V. Sanches, M.M. Seneda. 2005. Obtenção de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas nelores (*Bos taurus indicus*) tratadas com FSH previamente à aspiração. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33: 369.
- Pawlyshyn, V., C.E. Lindsell, M. Braithwaite, R.J. Mapletoft. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. *Theriogenology*, 21: 37.
- Pieterse, M.C. and K.A. Kappen. 1992. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 762.
- Pieterse, M.C., K.A. Kappen, A.M. Kruip, M.A.M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-756.
- Prado, F. R. DE A. 2006. Protocolos de superovulação em vacas da raça gir quanto ao número de estruturas totais, embriões viáveis e degenerados. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual Paulista. 50 p.

- Puelker, R.Z., C.R. Esper, K.B. Avelino, R. Vantini, C.F.M. Rodrigues, J.M. Garcia. 1999. Avaliação do método de sincronização da onda folicular de vacas submetidas a estimulação com FSH para a produção *in vitro* de embriões. *Arquivos da Faculdade de Veterinária*, 27: 278.
- Ramos, A.A., A.M. Ferreira, W.F. Sá, L.S.A. Camargo, J.H.M. Viana, M.R.J.M. Henry. 2006. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. *Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, 58: 341-347.
- Roover, R., G. Genicot, S. Leonard, P. Bols, F. Dessy. 2005. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*, 86: 13–25.
- Rouillier, P., L.A. Guilbault, J.G. Lussier, P. Matton. 1996. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology*, 46: 1053–1061.
- Sendag, S, Y. Cetin, M. Alan, K. Haderler, H. Niemann. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 106: 208–214.
- Satrapa, R.A., M.M.G. Ferreira, F.M. Monteiro, B.G. Ederhardt, D.S. Melo, J.R. Potiens, C.M. Barros. 2005. Influência de protocolos de superestimulação e privação hormonal na produção *in vitro* de embriões nelore (*Bos taurus indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, 33: 404-404.
- Saunders, J., N. Wilmott, A. Palasz, R.J. Mapletoft. 1990. Dose titration of Folltropin in the cow. *Theriogenology*, 33: 319.
- Stubbings, R.B. and J.S. Walton. 1995. Effect of ultrasonically- guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, 43: 705-712.
- Tribulo, H., F. Jofre, J. Carcedo, A. Alonso, R. Tribulo, G.A. Bó. 1993. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extrats. *Theriogenology*, 39: 331.
- Wang, H., M. Wu, D. Patt, B.D. Murphy, R.J. Mapletoft. 1988. Superovulation in beef heifers with PMSG: effect of dose and monoclonal antibodies to PMSG. *Theriogenology*, 29: 322.