



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATHALIA COVRE DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA ONDA DE CRESCIMENTO
FOLICULAR EM OVÁRIOS DE ABATEDOURO SOBRE A
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Londrina
2019

NATHALIA COVRE DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA ONDA DE CRESCIMENTO
FOLICULAR EM OVÁRIOS DE ABATEDOURO SOBRE A
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2019

B222d Silva, Nathalia Covre.
Gerência de redes – protocolo SNMP / Nathalia Covre da Silva. –
Londrina, 2019.
74f.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2019.
Inclui bibliografia.

CDU 641:579

NATHALIA COVRE DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA ONDA DE CRESCIMENTO
FOLICULAR EM OVÁRIOS DE ABATEDOURO SOBRE A
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Prof. Dr. Luciana Simões Rafagnin Marinho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2019.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC.**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**

DEDICO

À Deus e a Mãe de Deus.
Aos meus familiares e amigos.
À equipe Reproa.
Com todo carinho e gratidão.

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço a Deus por novamente cumprir em mim seus desígnios, sendo fiel ao me capacitar e dar o amparo necessário para que eu consiga realizar os sonhos que Ele inspira em meu coração.

Gratidão especial a Mãe de Deus pela certeza de sua presença constante em minha vida, tendo o perfeito cuidado de todas as situações e sendo minha grande educadora, exemplo do fiel cumprimento do dever com amor e generosidade.

Com carinho, agradeço meus pais Ricardo e Sueli, minhas irmãs Ananda e Manuela e minhas avós Maria e Brandina por serem minha base forte, meus maiores incentivadores e por existirem trazendo sentido a minha jornada.

Também agradeço o meu professor orientador Marcelo Seneda por todas as oportunidades que tem me dado, pela confiança em mim depositada e principalmente pelos conhecimentos e sabedoria compartilhados neste tempo de convívio. À todos os membros e frequentadores do ReproA, cada um a seu modo tem contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de registrar um agradecimento especial aos envolvidos diretamente no meu projeto: Tamires Sanches, Amanda Zangirolamo e Fábio Morotti. É sempre um prazer trabalhar com vocês!

E por último, mas não menos importante, minhas amigas da faculdade: Stéfany Camilo e Lais Sargi, poder dividir com vocês os anseios e as alegrias da profissão e da vida me fortalece, torna o caminho mais confortável, multiplica nossas conquistas! Obrigada!

"Quantas coisas Deus poderia fazer conosco, se tivéssemos a singeleza de simplesmente dizermos 'sim' como uma criança. Queremos tomar nas mãos a nossa educação, queremos ser uma geração de pequenos heróis!

Excelsior! Sempre mais para o alto. Fora com toda a mediocridade!

Sem dificuldades, sem sacrifícios, sem luta, jamais chegaremos ser algo grande. Grandes homens crescem na cruz!"

Padre José Kentenich

SILVA, Nathalia Covre. **Influência do momento da onda de crescimento folicular em ovários de abatedouro sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) muito tem contribuído para o desenvolvimento da pecuária. Para tornar esta biotécnica mais eficiente busca-se agora determinar o momento ideal do ciclo estral da fêmea bovina para a recuperação de oócitos com melhor qualidade. Visando o uso racional da aspiração folicular, seja por *ovum pick up* (OPU) ou em ovários de abatedouro, o presente estudo teve como objetivo investigar qual o impacto do momento da onda de crescimento folicular sobre a taxa de produção *in vitro* de embriões. Para isto, ovários de fêmeas *Bos indicus* (N = 196) foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em recipiente térmico contendo solução de NaCl 0,9% aquecida a temperatura de 36°C. Em seguida, no laboratório, foi realizada a avaliação de cada par de ovários individualmente. As estruturas analisadas foram os folículos, quanto à ocorrência ou não da divergência folicular (sendo considerado folículo dominante – FD - aquele ≥ 6 mm), e o corpo lúteo (CL), quanto à sua presença/ausência e estágio de desenvolvimento. Posteriormente, os pares ovarianos foram alocados entre os seguintes grupos experimentais: G1 – CL inicial e ausência de folículo dominante; G2 – CL e ausência de folículo dominante; G3 – CL inicial e presença de folículo dominante; G4- CL e presença de folículo dominante. O grupo controle não passou por avaliação e classificação, todos os ovários foram aspirados aleatoriamente (n= 13 pares). Os oócitos foram recuperados por aspiração folicular, em seguida foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*, cada grupo individualmente. As taxas de clivagem e blastocisto foram analisadas por teste de regressão logística binária ($P \leq 0,05$). A taxa de clivagem obtida, em ordem decrescente entre os grupos, foi de 50,22% (229/456) para o grupo G4 (CL e presença de FD); 45,65% (252/552) grupo G3 (CL inicial e presença de FD); 44,06% (89/202) grupo G2 (CL e ausência de FD); 36,23% (50/138) grupo Controle e 35,19% (120/341) grupo G1 (CL inicial e ausência de FD; $P < 0,0001$). Por outro lado, a melhor taxa de blastocisto obtida em D7 foi de 37,62% (76/202) pertencente ao grupo G2; seguida por 29,62% (101/341) referente ao grupo G1 e 26,81% (37/138) do grupo Controle; sendo que as menores taxas de blastocisto foram dos grupos G4 e G3; 10,09% (46/456) e 9,24% (51/552), respectivamente ($P < 0,0001$). Como conclusão, podemos sugerir que a aspiração folicular pós abate de pares ovarianos com presença de corpo lúteo funcional associado à ausência de folículo dominante proporciona a recuperação de oócitos com maior qualidade e o incremento nos resultados da produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões. Onda de crescimento folicular. *Bos indicus*. Ciclo estral.

SILVA, Nathalia Covre. **Influence of follicular growth wave moment on slaughter ovaries on the *in vitro* production of bovine embryo**. 2019. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

In vitro embryo production (PIVE) has contributed to the development of livestock. To make this biotech more efficient, it is now sought to determine the ideal moment of the estrous cycle of the bovine female for the recovery of oocytes with better quality. Aiming at the rational use of follicular aspiration, either by ovum pick up (OPU) or with slaughter ovaries, the present study had as objective to investigate the impact of the moment of the wave of follicular growth on the rate of *in vitro* production of embryos. For this, ovaries of *Bos indicus* females (N = 196) were collected in the local slaughterhouse and transported to the laboratory in a thermostatic container containing NaCl 0,9% solution heated to 36 ° C. Then, in the laboratory, the evaluation of each pair of ovaries individually was performed. The structures analyzed were the follicles, whether or not follicular divergence was established (dominant follicle - FD - that ≥ 6 mm), and the corpus luteum (CL), in terms of their presence/absence and stage of development. Subsequently, ovarian pairs (N = 196) were allocated between the following experimental groups: G1 – initial CL and absence of dominant follicle; G2 - CL and absence of dominant follicle; G3 - initial CL and presence of dominant follicle; G4-CL and presence of dominant follicle. The control group did not undergo evaluation and classification, all ovaries were randomly aspirated (n = 13 pairs). The oocytes were recovered by follicular aspiration, then matured, fertilized and cultured *in vitro*, each group individually. The cleavage and blastocyst rates were analyzed per binary logistic regression test ($P \leq 0,05$). The cleavage rate obtained, in decreasing order among the groups, was 50.22% (229/456) for the G4 group (CL and presence of FD); 45.65% (252/552) G3 group (initial CL and presence of FD); 44.06% (89/202) G2 group (CL and absence of FD); 36.23% (50/138) Control group and 35.19% (120/341) G1 group (initial CL and absence of FD; $P < 0,0001$). On the other hand, the best blastocyst rate obtained in D7 was 37.62% (76/202) belonging to the G2 group; followed by 29.62% (101/341) for the G1 group and 26.81% (37/138) for the Control group; with the lowest rates of blastocyst being in groups G4 and G3; 10.09% (46/456) and 9.24% (51/552), respectively ($P < 0,0001$). As a conclusion, we can suggest that follicular aspiration after the slaughter of ovarian pairs with the presence of functional corpus luteum associated with the absence of dominant follicle provides the recovery of oocytes with higher quality and increase in the results of *in vitro* production of embryos.

Key words: *In vitro* production of embryos (IVPE). Follicular growth wave. *Bos indicus*. Estrous cycle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Dinâmica folicular em fêmeas com ciclo estral de duas ou três ondas de crescimento folicular.	29
Figura 2 –	Esquema simplificado da oogênese e foliculogênese.....	31
Figura 3 –	Esquema da metodologia utilizada para avaliação das estruturas ovarianas.....	54
Figura 4 –	Caracterização do diâmetro folicular no momento do desvio em fêmeas da raça Nelore.....	55
Figura 5 –	Grupos experimentais de acordo com as características das estruturas ovarianas (Corpo lúteo e Folículos).....	56
Figura 6 –	Taxa de blastocisto a partir de ovários com presença ou ausência de folículo dominante no momento da aspiração folicular ovariana em bovinos	71
Figura 7 –	Taxa de blastocisto a partir de ovários com corpo lúteo em diferentes estágios de desenvolvimento no momento da aspiração folicular ovariana em bovinos.....	72
Figura 8 –	Indicação do momento da onda de crescimento folicular em que se encontram os grupos experimentais do presente estudo.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos obtidos a partir da aspiração folicular ovariana contendo diferentes estruturas lúteas (corpo lúteo inicial/corpo lúteo), associados ou não à presença do folículo dominante.	70
-------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Precisão dos estágios de previsão do ciclo estral bovino pela aparência bruta do corpo lúteo.	55
-------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
CL	Corpo Lúteo
FD	Folículo Dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
P4	Progesterona
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
CIV -	Cultivo <i>In Vitro</i>
COC's	Complexo Cumulus-Oophorus
D3	Dia 3
D5	Dia 5
D7	Dia 7
NaCl	Cloreto de Sódio
mRNA	RNA Mensageiro
Ca ²⁺	Íon Cálcio
AMP	Adenosina 3',5'- Monofosfato
SOF	<i>Synthetic Oviductal fluid</i>
TBM	<i>Tris-buffered medium</i>
TCM-199	<i>Medium 199</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
PGF2 α	Prostaglandina F2alfa
PGF	Prostaglandina E
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BMP	Proteína Morfogenética Ossea
TGF	Fator de Crescimento Transformador
KGF	Fator de Crescimento Queratinócito
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
	REFERÊNCIAS	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	24
2.1.1	Maturação <i>In Vitro</i> de Oócitos	24
2.1.2	Fecundação <i>In Vitro</i>	26
2.1.3	Cultivo <i>In Vitro</i> de Embriões	27
2.2	CICLO ESTRAL	28
2.3	DINÂMICA FOLICULAR	30
2.3.1	Oogênese e Foliculogênese	30
2.3.2	Recrutamento.....	31
2.3.3	Dominância Folicular	32
2.3.4	Ovulação e Formação do Corpo Lúteo.....	32
2.3.5	Atresia Folicular	33
2.4	INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL SOBRE A PIVE.....	35
	REFERÊNCIAS	37
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	49
4	ARTIGO A – Influence of follicular growth wave moment on slaughter ovaries on the <i>in vitro</i> production of bovine embryo	50
	RESUMO	50
4.1	INTRODUÇÃO.....	52
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.2.1	Classificação dos Pares Ovarianos de Acordo com o Momento da Onda Folicular	53
4.2.2	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões Bovinos	57

4.2.2.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	57
4.2.2.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	57
4.2.2.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	58
4.2.3	Análise Estatística.....	58
4.3	RESULTADOS.....	58
4.4	DISCUSSÃO.....	59
4.5	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
5	CONCLUSÕES.....	74

1 1 INTRODUÇÃO

2
3 Ao longo dos anos houve uma tecnificação da pecuária visando alcançar a
4 maior eficiência nas cadeias produtivas da carne e do leite. Neste cenário, as biotécnicas da
5 reprodução tem desempenhado importante função para o melhoramento genético e eficiência
6 reprodutiva dos planteis. Dentre elas, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE), por
7 ser uma técnica bem estabelecida e que tem sido amplamente aplicada na última década
8 (PONTES et al., 2011).

9 Neste contexto, o Brasil é o grande responsável pela consolidação e
10 disseminação da PIVE devido às características inerentes ao próprio sistema de produção
11 nacional que possui um rebanho composto majoritariamente por animais *Bos indicus*
12 (THIBIER, 2006), possibilitando assim, a produção de embriões em larga escala. É sabido
13 que fêmeas desta subespécie apresentam maior número de ondas de crescimento folicular por
14 ciclo estral (FIGUEIREDO, 1997; VIANA, 2000), assim como, maior número de folículos
15 recrutados por onda quando comparadas às fêmeas *Bos taurus* (SEGERSON et al., 1984;
16 CARVALHO et al., 2008). São recuperados em média entre 18 a 25 oócitos por sessão de
17 aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum pick up*/OPU) nas fêmeas *Bos indicus*
18 (THIBIER, 2004; WATANABE, 2017).

19 Como dito anteriormente, as técnicas de OPU/PIVE são procedimentos bem
20 estabelecidos, a taxa de produção embrionária final permanece em torno de 35 a 40%
21 (MAYES e SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006) e dos blastocistos produzidos apenas 30%
22 chegam a termo após transferência para a receptora (WARD et al., 2002; PARK et al., 2005).
23 Visto que já se possui o domínio das técnicas, para alcançar um incremento nos resultados,
24 buscam-se agora pequenos ajustes que estão mais relacionados à qualidade do oócito
25 recuperado.

26 É importante considerar que o crescimento do oócito incluso no ambiente
27 folicular, assim como a viabilidade e competência deste para o desenvolvimento *in vitro*, são
28 diretamente influenciados por fatores relacionados à fisiologia da doadora. Dentre tais fatores
29 tem-se: dia do ciclo estral, tamanho do folículo, presença do corpo lúteo (CL), estágio de
30 desenvolvimento folicular (crescimento/dominância) e nível de atresia (FERREIRA, 2014;
31 HAJARIAN et al., 2016; MELLO et al., 2016).

32 Fisiologicamente o oócito fecundado na fêmea provem de um folículo
33 maduro em um momento específico do ciclo estral, por outro lado, na recuperação por meio
34 da OPU os oócitos são obtidos de folículos em diferentes etapas da onda de crescimento

1 folicular. Portanto, estão expostos a variadas concentrações hormonais e de fatores de
2 crescimento que podem prejudicar sua competência para o desenvolvimento *in vitro* (WIT et
3 al., 2000). Em um estudo no qual a aspiração folicular foi realizada em um momento aleatório
4 do ciclo estral, foi verificado que mais de 85% dos folículos ovarianos são atresicos (SIRARD
5 et al., 1999). Tal resultado reforça as evidências de que a origem do folículo é importante para
6 determinar a qualidade oocitária. Recentemente foi observado que a sincronização da onda
7 folicular anterior a OPU proporciona um incremento nas taxas de produção embrionária e
8 concepção pós-transferência para as receptoras (CAVALIERI et al., 2018).

9 Neste contexto, algumas estruturas ovarianas podem auxiliar na identificação
10 do melhor momento para recuperação dos oócitos de boa qualidade e evitar aqueles inclusos
11 em folículos já em processo de atresia. O corpo lúteo, por exemplo, é formado após a
12 ocorrência da ovulação e por isso pode ser considerado um indicador do estágio reprodutivo
13 da fêmea (PENITENTE-FILHO et al., 2014). Além disso, a presença do CL no ovário tem se
14 mostrado um critério de seleção para a recuperação de oócitos em bovinos, uma vez que tal
15 estrutura está envolvida na manutenção da gestação e regulação do ciclo estral (PIRESTANI
16 et al., 2011; PENITENTE-FILHO et al., 2014; HAJARIAN et al., 2016). Adicionalmente,
17 estudos demonstraram que os folículos em desenvolvimento adjacente ao CL ativo possuem
18 maior diâmetro e perfusão sanguínea que leva ao estabelecimento mais eficaz da dominância
19 (GINTHER et al., 2019).

20 Outra importante estrutura a ser avaliada é o folículo ovariano. Sabe-se que a
21 competência oocitária é adquirida concomitantemente ao desenvolvimento folicular e que a
22 maturação nuclear e citoplasmática do oócito deve ser efetiva para que este seja capaz de
23 gerar e estocar mRNA para garantir a produção de proteínas necessárias ao seu
24 desenvolvimento inicial como zigoto, até o momento em que o genoma embrionário seja
25 ativado (CAIXETA et al., 2013). Desta forma, a boa qualidade do oócito está diretamente
26 relacionada ao momento da onda em que estes são obtidos, dado que a ocorrência do processo
27 de divergência folicular desencadeia níveis de atresia nos folículos subordinados devido à
28 presença do folículo dominante (HAGEMANN, 1999a; HAGEMANN et al., 1999b;
29 GINTHER et al., 2003).

30 Portanto, para melhor compreender qual o impacto do momento da onda de
31 crescimento folicular sobre a qualidade oocitária e a capacidade do oócito em desenvolver-se
32 em um embrião, o presente estudo visa estabelecer a relação entre características morfológicas
33 ovarianas das estruturas foliculares e luteínicas com a fase do ciclo estral das doadoras *Bos*
34 *indicus*. Assim, tornar a técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos mais rentável,

1 principalmente possibilitando o uso racional dos ovários provenientes de abatedouro, uma vez
2 que estes são utilizados na área da pesquisa e por laboratórios comerciais durante a realização
3 de testes, padronizações e controle de qualidade das rotinas da PIVE.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

- 1 GINTHER, O. J.; RAKESH, H. B.; BASHIR, S. T.; HOFFMAN, M. M. Relationship
2 between days of the luteolytic period and locations of the preovulatory follicle and CL in
3 interovulatory intervals with two or three follicular waves in heifers. **Theriogenology**, v. 81,
4 p. 787–96, 2014.
5
- 6 GINTHER, O. J. Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus
7 luteum in monovulatory heifers, mares, and women. **Theriogenology** (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.019>.
8
9
- 10 HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M.; DONNISON, M. J.; LEDGARD, A.;
11 PETERSON, A. J. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles:
12 interactive effects of estrous cycle stage follicle size and atresia. **Molecular Reproduction**
13 **and Development**, v.53, p. 451–458, 1999a.
14
- 15 HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles.
16 **Theriogenology**, v. 51, p. 449-459, 1999b.
17
- 18 HAJARIAN, H.; SHAHSAVARI, M. H.; KARAMI-SHABANKAREH, H.; DASHTIZAD,
19 M. The presence of corpus luteum may have a negative impact on *in vitro* developmental
20 competency of bovine oocytes. **Reproductive Biology**, 2016. v. 16, p. 47-52.
21
- 22 MAYES, M.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and
23 meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55,
24 p.911-922, 2001.
25
- 26 MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUZA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H.
27 B. Factors associated to the donor influencing the production of embryos *in vitro* (PIVE).
28 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 51-57, 2016.
29
- 30 PARK, Y. S.; KIM, S. S.; KIM, J. M.; PARK, H. D.; BYUN, M. D. The effects of duration of
31 *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of
32 embryos. **Theriogenology**, v. 64, p. 123-134, 2005.

- 1
2 PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E.; OLIVEIRA, F. A.; ZOLINI, A. M.;
3 OLIVEIRA, C. T.; SOARES, Í. A. C.; TORRES, C. A. A. Influence of dominant follicle and
4 corpus luteum on recovery of good quality oocytes for *in vitro* embryo production in cattle.
5 **British Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1305-1312, 2014.
6
7 PIRESTANI, A.; HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; FOROUZANFAR, M.; MOULAVI, F.;
8 ABEDI, P. Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle.
9 **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 4, p. 172-175, 2011.
10
11 PONTES, J. H. F.; MELO-STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES,
12 B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and
13 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
14 donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.
15
16 SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R.
17 Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal Animal**
18 **Science**, v. 59, p. 1026–1046, 1984.
19
20 SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M. The time between FSH administration and ovarian
21 aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 699-708,
22 1999.
23
24 SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progress and its
25 relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241–1254, 2001.
26
27 SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDRIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to
28 embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.
29
30 THIBIER, M. Role of reproductive biotechnologies: Global perspective, current methods and
31 success rates. In: SIMM, G. **Farm Animal Genetic Resources**, BSAS Publication 30,
32 Nottingham University Press, p. 171-190, 2004.
33

- 1 THIBIER, M. Transfers of both *in vivo*-derived and *in vitro* produced embryos in cattle still
2 on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **IETS Embryo Transfer**
3 **Newsletter**, v. 24, p. 11–19, 2006.
4
- 5 VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics
6 in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501–2509, 2000.
7
- 8 WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of *in*
9 *vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-
10 incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p. 2105-2117, 2002.
11
- 12 WATANABE, Y. F.; DE SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA,
13 E. O. S.; DAVAN, A.; WATANABE, O. Y.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.;
14 FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU
15 and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo
16 transfer. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 635–
17 644, 2017.
18
- 19 WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian and follicle quality on
20 morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal**
21 **Animal Science**, v.78, p.1277-83, 2000.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi desenvolvida na Inglaterra na década de 1970 quando nasceu Louise Brown, o primeiro bebê de proveta, no ano de 1978 (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Alguns anos mais tarde, em 1982 nos Estados Unidos da América, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* (BRACKETT et al., 1982). Na espécie bovina, a PIVE é uma biotécnica que vem sendo amplamente utilizada em larga escala na última década e muito tem colaborado com o aumento da produtividade nos rebanhos, tornando mais eficiente as cadeias produtivas da carne e do leite (PONTES et al., 2011; VIANA, 2012).

Esta biotécnica consiste na obtenção de oócitos (gameta feminino) para o uso em laboratório, onde tais estruturas passam pelas etapas da maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, sendo esta última a responsável pelo desenvolvimento embrionário até os estágios de mórula e blastocisto, momento em que os embriões serão transferidos para as receptoras ou criopreservados (VARAGO et al., 2008). Dentre as vantagens proporcionadas pelo uso da PIVE podem-se citar a multiplicação e disseminação de animais com alto potencial zootécnico, por meio da escolha do reprodutor e da doadora para o cruzamento, bem como, a aceleração do ganho genético entre as gerações que tem tornado esta biotécnica cada vez mais acessível (PONTES et al., 2009; MOROTTI et al., 2017).

Por fim, cabe ressaltar que os embriões podem proporcionar melhores resultados de prenhez nos períodos mais quentes do ano para o gado de leite, tendo em vista que são mais resistentes ao estresse térmico quando comparado aos gametas. Também, possibilitam a maior eficiência do sêmen sexado e, conseqüentemente, o uso racional e estratégico das receptoras por meio da transferência de embrião do sexo feminino para gado leiteiro e embrião do sexo masculino para gado de corte, tornando-se assim, importante ferramenta para o desenvolvimento no contexto da pecuária (PONTES et al., 2010; MOROTTI et al., 2014).

2.1.1 Maturação *In Vitro* de Oócitos

A maturação do oócito é considerada condição fundamental para que esta estrutura se torne competente para a fecundação e para o desenvolvimento embrionário

1 inicial. Este evento compreende a maturação nuclear e a maturação citoplasmática; caso
2 ambas não ocorram de maneira adequada a fecundação é inviabilizada, podendo ocorrer
3 partenogênese, polispermia ou até bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI,
4 2005).

5 A maturação nuclear ocorre quando o oócito retoma a primeira meiose, que
6 teve início ainda na fase fetal, e progride para as fases de metáfase I, anáfase I, telófase I. É
7 caracterizada pela quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucleolo, condensação
8 da cromatina, desintegração do núcleo, extrusão do primeiro corpúsculo polar e o bloqueio da
9 segunda meiose em metáfase II. A ativação do oócito secundário e a conclusão da segunda
10 meiose ocorrem somente no momento da fecundação e culminam na extrusão do segundo
11 corpúsculo polar, a partir daí o zigoto continua seu desenvolvimento por divisão mitótica
12 (GORDON, 1994; MEINECKE et al., 2001; JONES, 2004).

13 Por outro lado, a maturação citoplasmática engloba alterações bioquímicas e
14 estruturais, dentre elas, a redistribuição de organelas intracelulares, como a migração das
15 mitocôndrias para a região perinuclear e o depósito dos grânulos corticais sob a membrana
16 vitelina. Adicionalmente, ocorre a maturação dos mecanismos de liberação do cálcio e
17 eventos moleculares para a estocagem de transcritos e proteínas responsáveis pelo
18 desenvolvimento embrionário inicial, anterior à ativação do genoma do embrião (CRAN,
19 1989; MERMILLOD et al., 2000; STOJKOVIC et al., 2001).

20 Na fêmea, fisiologicamente, o oócito torna-se competente para a fecundação
21 e desenvolvimento em um período concomitante à fase de desenvolvimento folicular
22 (LONERGAN et al., 2003). Este período compreende a onda do hormônio luteinizante (LH) e
23 a ovulação (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; SÁNCHEZ e SMITZ, 2012). Sabe-se que o
24 ambiente folicular possui fatores inibitórios da maturação e que ao retirar o oócito do folículo
25 dá-se início a tal processo (EDWARDS, 1962; 1965). Portanto, *in vitro* é possível promover a
26 maturação oocitária com a remoção desta estrutura do interior do folículo e posterior cultivo
27 em meio e condições ambientais adequados.

28 O tempo máximo para esta etapa em laboratório é de 24 horas (SIRARD,
29 1989; WEHREND e MEINECKE, 2001); os oócitos maturados em período maior que o
30 recomendado apresentam redução na competência após a fecundação *in vitro*, efeito negativo
31 do envelhecimento oocitário sobre a produção de embriões (GORDON, 1994). Após a etapa
32 da maturação é esperado que o oócito apresente as camadas de células do cumulus de cor
33 clara e expandida, aqueles que tiverem estas características tendem a apresentar melhores
34 resultados ao serem fecundados (SIRARD e LAMBERT 1985, 1986; HYTTTEL et al., 1986).

2.1.2 Fecundação *In Vitro*

Para a formação do embrião é necessário que ocorra a fecundação do oócito maturado pelo espermatozoide capacitado. *In vivo*, a capacitação espermática acontece no trato reprodutivo da fêmea (ASSUMPÇÃO et al., 2002), sendo que neste processo os fatores decapacitantes do plasma seminal são removidos. Basicamente acontecem alterações bioquímicas para aumentar a fluidez da membrana espermática, entre tais alterações tem-se a remoção do colesterol, entrada de Ca^{2+} intracelular, mudança na atividade enzimática da proteína quinase C (PKC) e o aumento da concentração de AMP cíclico, desencadeando assim, uma hiperativação transitória na motilidade espermática (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000). Em seguida, o espermatozoide hiperativado se liga por interação receptor-proteína à zona pelúcida do oócito para induzir a reação acrossômica (FLORMAM e FIRST, 1988). Nesta reação ocorre a liberação de enzimas hidrofílicas, presentes no acrossoma, por meio de exocitose para degradar a zona pelúcida e permitir a penetração do espermatozoide no oócito por uma fusão das membranas (SHIDU e GURAYA, 1989).

Na técnica *in vitro*, o uso da heparina é a forma mais eficiente para induzir a capacitação espermática, uma vez que esta substância é um glicosaminoglicano que durante o estro está presente em altas concentrações no trato reprodutivo da fêmea (GORDON, 1994). A heparina se liga à membrana plasmática do espermatozoide e ativa canais iônicos, permitindo o aumento do fluxo de Ca^{2+} para o espaço intracelular, aumento do pH e a capacitação do gameta masculino (BAVISTER, 2002).

Em laboratório, após o descongelamento do sêmen é realizada a seleção dos melhores espermatozoides para a fecundação *in vitro*, sendo que os métodos existentes são o gradiente de Percoll, sistema *swim-up* e lavado espermático; dentre estes o mais utilizado é o primeiro citado (GALLI e LAZZARI, 1996). O Percoll é uma substância composta por partículas de sílica recobertas com polivinilpirrodona e preparado em gradientes de diferentes concentrações (90%, 45%, 30%) para a formação de duas ou três fases, pelas quais irão passar os espermatozoides a serem selecionados (GONSALVES et al., 2002).

Para a fecundação dos oócitos, estes são colocados em co-cultivo com os espermatozoides sob condições ambientais ideais (temperatura 39°C, atmosfera 5% CO_2 , ar e umidade saturada) por um período médio de 24 horas (GORDON, 1994; GONSALVES et al.,

1 2002; MINGOTI, 2005). A concentração espermática geralmente utilizada é de 1×10^6
2 espermatozoides viáveis/mL, calculada de acordo com o número de espermatozoides obtidos
3 após a centrifugação em gradiente de Percoll e a motilidade destes (GONSALVES et al.,
4 2002).

5 Com a fusão dos dois gametas e a retomada da segunda meiose o núcleo
6 espermático é descondensado e transformado no pró-núcleo masculino, este então migra para
7 a região central do oócito e com a desintegração do envelope nuclear, ocorre a união dos
8 cromossomos para a primeira divisão mitótica do zigoto.

9

10 2.1.3 Cultivo *In Vitro* de Embriões

11

12 Com duração de até sete dias, a partir da fecundação *in vitro*, a etapa do
13 cultivo é a mais longa (MINGOTI, 2005). É neste momento que o zigoto por meio de
14 sucessivas divisões (clivagens) associadas com alterações estruturais se desenvolve até os
15 estágios de mórula e blastocisto (YANAGIMACHI, 1994). No entanto, para a espécie bovina,
16 o quarto ciclo da divisão celular (quando o embrião está no estágio de oito células) é um
17 momento crítico em que pode ocorrer o bloqueio do desenvolvimento devido à ativação do
18 genoma embrionário (SCHULTZ et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2005). Neste contexto, o
19 sistema de produção *in vitro* busca suprir as necessidades ambientais e nutricionais do
20 embrião para possibilitar a continuidade e conclusão de seu desenvolvimento (MELLO et al.,
21 2016).

22

23 O meio de cultivo que demonstra ser mais eficiente até o momento é o
24 *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF), desenvolvido por Tervit et al. (1972) e modificado por
25 Takahashi e First (1992). Este meio pode ser suplementado ou não com fontes proteicas
26 como, o soro fetal bovino ou albumina sérica bovina para a estimulação da diferenciação e
27 proliferação celular embrionária (LIM et al., 1999; MINGOTI, 2005). As condições
28 atmosféricas do cultivo passam para 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% N₂, a temperatura de 39°C e
29 umidade saturada (MINGOTI, 2005). Isto porque, altos níveis de O₂ podem aumentar a
30 concentração de espécies reativas de oxigênio e induzir a apoptose em células embrionárias
31 (YUAN et al., 2003; HARVEY, 2007). Por outro lado, a baixa tensão de O₂ nesta fase pode
32 aumentar o diâmetro embrionário e a massa celular interna, possibilitando a formação de um
33 embrião de melhor qualidade (LIM et al., 1999). Ao final, a taxa de produção embrionária *in*
34 *vitro* para bovinos é em média de 25% a 40%, sendo esta espécie a que apresenta melhor
desempenho no uso desta biotécnica (KASSENS et al., 2015).

2.2 CICLO ESTRAL

A fêmea bovina entra em um período de ciclicidade logo após a puberdade que persistirá ao longo de toda sua vida reprodutiva. São ciclos de atividade ovariana que consistem numa série de mudanças dinâmicas envolvendo o crescimento e regressão dos folículos e do corpo lúteo (SARTORI et al., 2017). O ciclo estral bovino é dividido em quatro fases de acordo com a ocorrência de eventos fisiológicos e endócrinos sendo: proestro, estro, metaestro e diestro (CAETANO e CAETANO Jr., 2015). As duas primeiras (proestro e estro) também podem ser denominadas fase folicular, quando ocorre o desenvolvimento dos folículos culminando na ovulação. As duas últimas (metaestro e diestro) são referentes à fase lútea, caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo e secreção de progesterona. Caso não ocorra a fecundação, o corpo lúteo formado após a ovulação regride por volta do 15º ao 17º dia, e inicia-se uma nova fase folicular. Assim, o intervalo médio entre dois ciclos estrais é de 21 dias (WILTBANK et al., 2002).

O dia do estro é considerado o dia zero do ciclo estral, quando a fêmea apresenta receptividade sexual seguida por ovulação. Neste dia também ocorre a emergência da primeira onda de crescimento folicular (AERTS e BOLS, 2010). A onda folicular é uma sequência de eventos que compreende o recrutamento e crescimento de um grupo de folículos antrais, seguido pela seleção de um folículo dominante concomitante à regressão dos folículos subordinados (BARUSELLI et al., 1997). A regulação da onda folicular é realizada por mecanismos de retroalimentação envolvendo principalmente os hormônios GnRH, FSH, LH, estradiol e progesterona (MELLO et al., 2014).

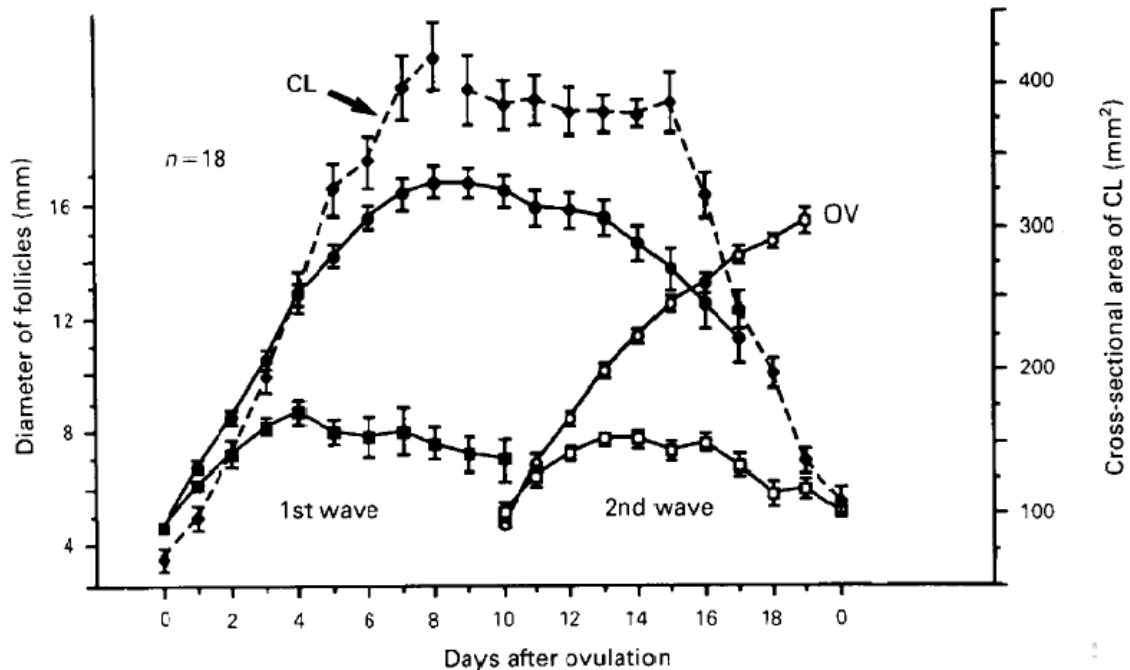
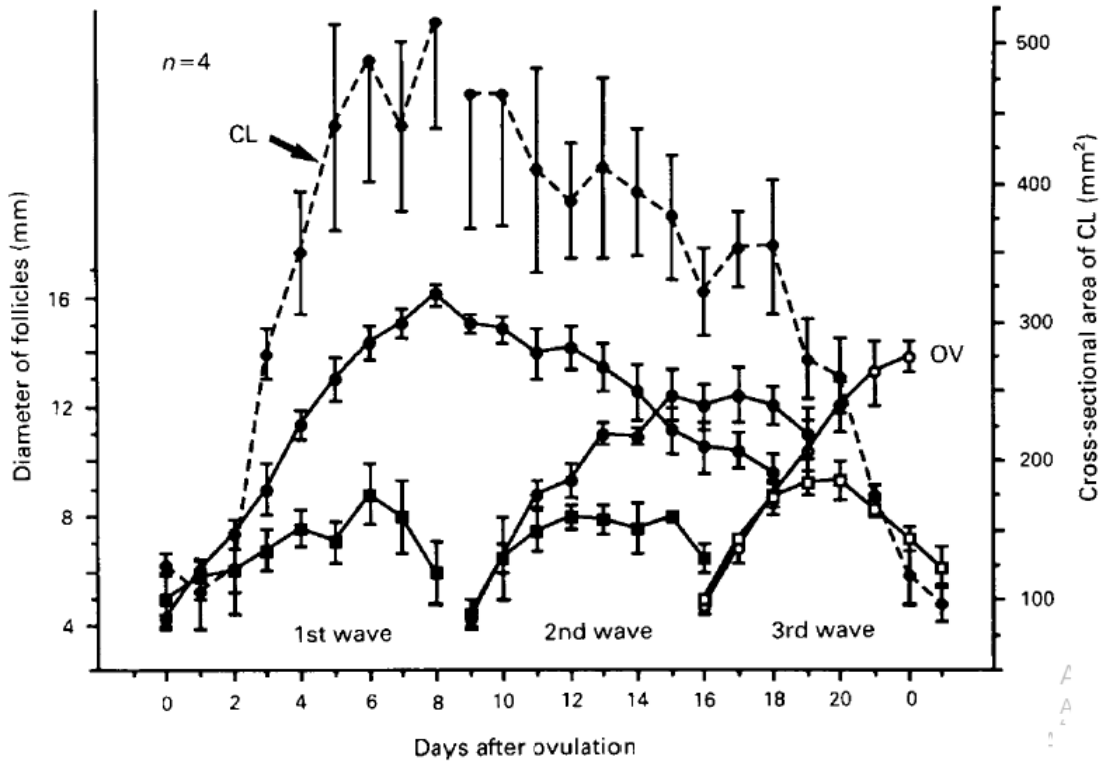
O número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral pode variar entre as subespécies, em *Bos taurus* normalmente são manifestadas somente duas enquanto as fêmeas *Bos indicus* manifestam três ondas (GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997). Cabe ressaltar que fatores intrínsecos à fêmea como nutrição, condição corporal, lactação, idade, raça e ambiente exercem influência sobre o número de ondas foliculares por ciclo estral (GINTHER et al., 1996).

Em animais com ciclos de duas ondas, a emergência da segunda ocorre no 9º ou 10º dia do ciclo, enquanto que nos animais que apresentam três ondas a segunda emerge no 8º ou 9º dia e a terceira no 15º ou 16º dia do ciclo estral. A regressão do corpo lúteo inicia-se por volta do 16º dia nas fêmeas com ciclo de duas ondas e por volta do 19º dia nas que apresentam ciclo de três. Desta forma, pode-se dizer que existem o ciclo estral curto (duas

1 ondas) com duração de 19 a 20 dias e o ciclo estral longo (três ondas) que dura de 22 a 23
 2 dias, tendo em média 21 dias o ciclo estral bovino (ADAMS et al., 2008), como mostra a
 3 Figura 1.

4

5 **Figura 1** – Dinâmica folicular em fêmeas com ciclo estral de duas ou três ondas de
 6 crescimento folicular.



9 Perfil médio dos diâmetros do folículo dominante e do maior subordinado; área luteinizada
 10 transversal do corpo lúteo (CL) para intervalos interovulatórios com duas e três ondas

1 foliculares. Regressão ($P < 0.05$) do corpo lúteo começou entre os dias 18 e 20 para intervalos
2 de três ondas e entre os dias 15 e 16 para intervalos de duas ondas. OV = ovulação. **Fonte:**
3 Ginther et al., 1989.

5 2.3 DINÂMICA FOLICULAR

7 A dinâmica folicular é o processo de crescimento e regressão dos folículos
8 que leva ao desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório, já o padrão de ocorrência da
9 dinâmica folicular em um grupo de folículos é denominado onda de crescimento folicular
10 (LUCY et al., 1992). Em bovinos, os folículos são formados ainda na fase fetal por meio de
11 dois processos que são denominados oogênese e foliculogênese, assim, ao nascimento as
12 fêmeas já possuem um estoque folicular definido que será consumido ao longo da vida
13 durante as ondas de crescimento folicular (SAUMANDE, 1991).

15 2.3.1 Oogênese e Foliculogênese

17 A oogênese refere-se à formação do oócito (RUSSE, 1983), quando as
18 células germinativas primordiais, originadas no endoderma embrionário, tornam-se ovogônias
19 e posteriormente oócitos primários, por meio de uma sequência de eventos envolvendo o
20 desenvolvimento e a diferenciação celular. No momento da ovulação, o oócito primário
21 conclui sua primeira divisão meiótica liberando o primeiro corpúsculo polar e torna-se um
22 oócito secundário. Este processo é finalizado somente com a fecundação do oócito secundário
23 e a liberação do segundo corpúsculo polar (ADONAAB et al., 2013).

24 Concomitantemente à oogênese ocorre a foliculogênese, com a formação dos
25 folículos primordiais que progridem para folículos primários, secundários, terciários, pré-
26 ovulatórios e culmina com a ovulação de um oócito maduro (secundário; SAUMANDE,
27 1981). As alterações na morfologia folicular que caracterizam as etapas anteriormente citadas
28 estão relacionadas ao crescimento do oócito, à multiplicação e diferenciação das células da
29 granulosa que o circundam, ao surgimento da zona pelúcida e à formação do antro folicular
30 (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Os folículos são então, classificados em pré-
31 antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios;
32 MATSUDA et al., 2012).

33 Os folículos primordiais são compostos por um oócito envolto por uma
34 membrana basal e rodeado por uma única camada de células da pré-granulosa de formato
35 achatado (CHOWDHURY et al., 2016). Nos folículos primários o oócito passa a ser

1 circundado por uma camada de células da granulosa em formato cuboide (ARAÚJO et al.,
 2 2014). Os folículos secundários adquirem zona pelúcida e são caracterizados por possuírem
 3 duas ou mais camadas de células da granulosa que são circundadas por uma camada de
 4 células da teca (FIGUEIREDO et al., 1997; ARAÚJO et al., 2014). Por fim, os folículos
 5 terciários e pré-ovulatórios são constituídos de um oócito envolto pela zona pelúcida, várias
 6 camadas de células da granulosa, recobertas por duas camadas de células tecais (interna e
 7 externa), além de possuir cavidade antral contendo fluido folicular (GORDON, 1994;
 8 FIGUEIREDO et al., 2008). As etapas envolvidas na formação dos oócitos e folículos estão
 9 representadas na Figura 2.

11 **Figura 2** – Esquema simplificado da oogênese e foliculogênese.



12
 13 **Fonte:** Gonçalves et al., 2008.

14
 15 2.3.2 Recrutamento

16
 17 No início da onda de crescimento folicular, um grupo de folículos
 18 primordiais em estado de quiescência desde a idade fetal é ativado e inicia seu crescimento ao
 19 receber o estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), por um período médio de três
 20 dias (GINTHER et al., 2001). A proliferação celular destes folículos permite um aumento
 21 gradual na síntese de estradiol e inibina por estas estruturas (ADAMS et al., 1992). Nesta fase,

1 a taxa de crescimento é quem irá determinar qual será o folículo selecionado para exercer a
2 dominância sobre os demais (BARUSELLI et al., 1997; AERTS e BOLS, 2010). É importante
3 ressaltar que a inibina e o estradiol secretado pelo folículo dominante são substâncias que
4 suprimem a liberação do FSH pela hipófise, apesar do crescimento folicular ainda ser
5 dependente deste hormônio (AERTS e BOLS, 2010).

6 7 2.3.3 Dominância Folicular

8
9 A divergência folicular é o momento no qual o maior folículo da onda
10 continua se desenvolvendo até sua maturação e ovulação, enquanto o folículo secundário
11 passa a regredir (BARUSELLI et al., 2007). O folículo dominante exerce um mecanismo de
12 bloqueio no crescimento dos folículos menores que envolve a supressão dos níveis de FSH,
13 dado que este consegue dar continuidade ao seu desenvolvimento mesmo em níveis basais do
14 hormônio em questão (AERTS e BOLS, 2010). Na espécie bovina, os folículos antrais
15 adquirem receptores para o hormônio luteinizante (LH) quando apresentam aproximadamente
16 8 mm de diâmetro (AERTS e BOLS, 2010), assim, o crescimento do folículo dominante
17 deixa de ser dependente do FSH e passa a depender do LH (MIHM et al., 2006). O desvio
18 folicular em *Bos taurus* acontece quando o maior folículo atinge um diâmetro de 8 a 10 mm,
19 enquanto que em *Bos indicus* seu tamanho é de 5 a 7.5 mm (SARTORI et al., 2001). Desta
20 forma, pode-se considerar que o crescimento folicular depende do FSH até o momento da
21 divergência, quando ocorre o surgimento do folículo dominante o crescimento passa a ser LH
22 dependente (FORTUNE et al., 2001; BURATINI Jr., 2007).

23 24 2.3.4 Ovulação e Formação do Corpo Lúteo

25
26 Quando o crescimento do folículo dominante se dá na última onda de
27 crescimento folicular do ciclo estral, o ambiente ovariano apresenta baixo aporte de
28 progesterona (P4) devido à regressão do corpo lúteo oriundo da ovulação anterior. Desse
29 modo, há o aumento da concentração de estradiol que por um mecanismo de *feedback*
30 positivo desencadeia a secreção do GnRH pelo hipotálamo que, por sua vez, promove a
31 liberação de pulsos de LH pela hipófise, possibilitando a ocorrência da ovulação (FORTUNE,
32 1994). A ruptura da membrana folicular e a expulsão de um oócito maduro só é possível
33 devido à ação destes pulsos pré-ovulatórios de LH. Além de estimular a produção da
34 prostaglandina E (PGE) necessária para o rompimento do folículo, o LH também atua na

1 maturação oocitária e na luteinização das células granulosas e tecais (FILION et al., 2001;
2 AERTS e BOLS, 2010).

3 Após a ovulação forma-se o corpo lúteo hemorrágico, estrutura resultante do
4 colapso da parede folicular e da invasão cavitária por sangue e linfa provenientes do
5 próprio folículo ovulado. Posteriormente, com a diminuição da enzima P450 aromatase e o
6 auxílio de fatores angiogênicos, as células das camadas granulosa e tecal se reorganizam para
7 a formação do corpo lúteo, o qual deixa de sintetizar estradiol e passa a sintetizar
8 progesterona (VOSS e FORTUNE, 1993; BERTAN et al., 2006; SALES e ARAÚJO, 2010).

9 Durante a fase luteal o corpo lúteo aumenta em tamanho, sendo que o
10 volume da célula luteal funcional chega a ser 50 vezes maior que o volume apresentado pela
11 célula da granulosa antes do pico de LH (WILTBANK et al., 2002). A capacidade de liberar
12 progesterona também aumenta com o crescimento do CL, sendo esta estrutura a responsável
13 por evitar a ocorrência de pulsos adequados de LH e uma nova ovulação. Por fim, a involução
14 do corpo lúteo acontece por volta do 17º dia do ciclo estral, na ausência de substâncias
15 sinalizadoras do reconhecimento materno, quando o endométrio libera a prostaglandina F2 α
16 (PGF2 α) que ocasionará a luteólise e consequente redução dos níveis de progesterona,
17 permitindo a volta da pulsatilidade do LH e a ovulação (MORAES et al., 2001).

18

19 2.3.5 Atresia Folicular

20

21 Cerca de 99,9% dos folículos primordiais da reserva ovariana sofrem um
22 processo denominado atresia antes de chegar à ovulação (IRELAND, 1987). Isso porque o
23 folículo dominante bloqueia o desenvolvimento dos folículos menores que o acompanham
24 (GINTHER et al., 2003). Por outro lado, quando os folículos dominantes são provenientes de
25 ondas com presença de corpo lúteo ativo e adequado aporte de progesterona no ambiente
26 ovariano, estes não recebem as concentrações de LH necessárias para o seu desenvolvimento
27 final e também são impedidos de chegar à ovulação (MELO, 2009).

28

29 A atresia é um processo degenerativo ou apoptótico que ocorre quando os
30 fatores parácrinos, endócrinos e autócrinos estão em desajuste (HSU e HSUEH, 2000;
31 ARAÚJO et al., 2010). Os tecidos que sofrem algum estímulo fisiológico ou lesão ativam
32 uma programação de morte celular denominada apoptose (HUGHES e GOROSPE, 1991;
33 WONG, 2011). Este processo é regulado por expressão gênica e inicia-se quando existe um
34 desequilíbrio entre a expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (MAGALHÃES
et al., 2009).

1 Os níveis de apoptose são caracterizados por condensação da cromatina,
2 clivagem do material genético, agregação e desorganização das organelas no citoplasma,
3 retração da membrana plasmática e rompimento celular com a formação de corpos
4 apoptóticos (HUGHES e GOROSPE, 1991; TILLY, 1996; KAIPIA e HSUEH, 1997). Nos
5 folículos ovarianos o processo de atresia se manifesta de modo diferente conforme o estágio
6 de desenvolvimento. Em folículos pré-antrais a apoptose tem início no oócito e raramente é
7 observada nas células da granulosa; as características principais da atresia folicular pré-antral
8 são a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária. Já nos folículos antrais o
9 oócito adquire maior resistência e a apoptose se inicia nas células da granulosa que passam a
10 apresentar núcleo picnótico, condensação da cromatina e retração nuclear. Com a progressão
11 da atresia folicular antral é observada a diminuição do número de camadas de células da
12 granulosa até que, nos estágios finais, o oócito sofre pseudomaturação e se fragmenta
13 (HUGHES e GOROSPE, 1991; MORITA e TILLY, 1999; MATSUDA et al., 2012).

14 Entre os fatores que influenciam a ativação da morte celular nos diferentes
15 estágios de crescimento folicular podem-se citar o FSH, LH, kit-ligante, fator de crescimento
16 semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de
17 crescimento fibroblástico básico (FGFb), ativina e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)
18 (ARAÚJO et al., 2010). Em todos os estágios da onda folicular as gonadotrofinas FSH e LH
19 são importantes inibidores da apoptose nos folículos antrais, atuando na viabilidade dos
20 pequenos folículos em recrutamento até aqueles em estágios finais da maturação e pré-
21 ovulatórios (MARKSTROM et al., 2002). Os efeitos anti-apoptóticos do FSH e do LH são
22 intermediados pela ação dos fatores de crescimento locais (IGF-1, EGF, FGF-2, TGF- α e
23 KGF). Além de mediadores, estes fatores podem atuar diretamente na redução dos níveis de
24 apoptose nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (TILLY et al., 1992; CAROU
25 et al., 2017). Do mesmo modo, o estradiol também exerce o bloqueio na ativação da atresia
26 folicular (BILLIG et al., 1993). Por outro lado, as proteínas semelhantes ao GnRH, a
27 interleucina-6, os andrógenos, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o kit-ligante são fatores
28 pró-apoptóticos, pois quando ligados a receptores específicos ativam os mecanismos de
29 apoptose e atresia folicular (CAROU et al., 2017).

30 Em suma, as diferentes fases do ciclo estral expõem os folículos à variação
31 nas concentrações hormonais e de fatores de crescimento. Eventos como a divergência e a
32 dominância folicular podem modificar a relação na expressão dos fatores anti e pró-
33 apoptóticos. Desse modo, determinar a continuidade do desenvolvimento ou a ocorrência da

1 atresia no folículo e, assim, afetar a competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro* de
2 embriões (HSU e HSUEH, 2000; WIT et al., 2000).

3 4 2.4 INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL SOBRE A PIVE

5
6 A compreensão da fisiologia do ciclo estral bovino, assim como das etapas
7 envolvidas na PIVE, permitiu o surgimento de estudos que investigassem o efeito da
8 sincronização da onda de crescimento folicular sobre a obtenção de oócitos, visando o
9 incremento da produção embrionária ao fim do processo. Tem sido demonstrado que a
10 aspiração folicular quando realizada na emergência da onda, resulta em melhores taxas de
11 recuperação oocitária e melhor qualidade destas estruturas, devido à ausência de eventos
12 atrésicos (BACELAR et al., 2010; GIMENES et al., 2015).

13 Em fêmeas *Bos indicus* que foram submetidas ao protocolo hormonal para a
14 sincronização da emergência da onda folicular e aspiradas por meio da OPU no quinto dia do
15 protocolo, foram relatados a obtenção de maior taxa de produção embrionária (45.8% x
16 38.5%; P= 0.001) e maior taxa de concepção com a transferência destes embriões (2.2 ± 0.2 x
17 1.6 ± 0.2 ; P=0.07), quando comparadas as fêmeas não protocoladas (CAVALIERI et al.,
18 2018).

19 Do mesmo modo, em ovários de fêmeas que foram sincronizadas anterior ao
20 momento do abate, os oócitos recuperados entre os dias 14 a 16 do ciclo estral apresentaram
21 melhor competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro* quando comparados àqueles
22 aspirados entre os dias 7 a 9 e 19 a 20 (24,3% x 13,0% x 6,6%, respectivamente; P < 0,05). As
23 menores taxas de produção são referentes aos dias do ciclo estral nos quais havia a presença
24 do folículo dominante (MACHATKOVA et al., 1996). Estes resultados reforçam a
25 necessidade de encontrar o melhor momento da onda de crescimento folicular para a
26 recuperação de oócitos com melhor qualidade, ao invés de continuar realizando a aspiração
27 folicular em dias aleatórios do ciclo estral.

28 Neste contexto, existem estruturas ovarianas que podem auxiliar nesta
29 investigação. Tem sido relatado maior taxa de blastocistos (30,3% x 14,9%; P < 0:01) e maior
30 número médio de embriões por doadora (8.0 ± 1.2 x 3.8 ± 2.4 ; P = 0: 012) a partir de oócitos
31 provenientes de folículos na fase de crescimento, em relação aos folículos na fase de
32 dominância da onda (MACHATKOVA et al., 2004). Considerando o efeito negativo que o
33 folículo dominante exerce sobre a competência oocitária dos folículos subordinados, é

1 possível ressaltar a importância de avaliar as estruturas foliculares para determinar o melhor
2 momento para recuperação dos oócitos (HENDRIKSEN et al., 2000).

3 Por outro lado, o corpo lúteo também está diretamente envolvido na
4 regulação do ciclo estral, dado que esta estrutura sofre uma dinâmica mudança estrutural e
5 funcional que se manifesta pelo aumento gradual da secreção de progesterona, seguido por
6 uma diminuição ao final do ciclo (FIELD e FIELD, 1996). Desta forma, Ireland et al. (1980),
7 estipularam uma previsão do ciclo estral em fêmeas *Bos taurus* a partir da aparência do corpo
8 lúteo em ovários pós morte. Os quatro estágios de desenvolvimento do corpo lúteo
9 classificados pelo autor foram: Estágio I (características morfológicas referentes aos dias 1 a 4
10 do ciclo estral), Estágio II (características morfológicas referentes aos dias 5 à 10), Estágio III
11 (características morfológicas referentes aos dias 11 à 17) e Estágio IV (características
12 morfológicas referentes aos dias 18 a 20 do ciclo estral).

13 Tendo como base o conhecimento obtido até o momento, o presente estudo
14 visa avaliar as estruturas luteínicas e foliculares presentes no ovário de fêmeas *Bos indicus* e
15 estabelecer uma relação com a fase do ciclo estral das doadoras desta subespécie. Assim,
16 estabelecer o momento mais adequado para a recuperação dos oócitos que proporcionarão o
17 incremento nos resultados da PIVE e justificar o custo com o uso de protocolos hormonais em
18 fêmeas doadoras para a sincronização da onda folicular.

19

REFERÊNCIAS

- 1
2
- 3 ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P. Association between surges of follicle
4 stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of**
5 **Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.
- 6
- 7 ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. Progress in understanding ovarian follicular
8 dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80, 2008.
- 9
- 10 ADONAB, P. R.; MONZANIAB, P. S.; GUEMRAAB, S.; MIRANDA, M. S.; OHASHI, O.
11 M. Oogenesis and Folliculogenesis in Mammals. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e**
12 **da Saúde**, v. 15, p. 245-250, 2013.
- 13
- 14 AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the
15 bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects.
16 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 180-187, 2010.
- 17
- 18 ARAÚJO, V. R.;ALMEIDA, A. P.;MAGALHÃES, D. M. Papel das Proteínas
19 Morfogênicas Ósseas-6 e -7 (BMP-6 e -7) na regulação da foliculogênese inicial em
20 mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 69-78, 2010.
- 21
- 22 ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of
23 bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 78, p. 1-
24 14, 2014.
- 25
- 26 ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; HAIPECK, K.; LIMA, A. S.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA,
27 L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática *in*
28 *vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian**
29 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 149-156, 2002.
- 30
- 31 BACELAR, D.; MAX, M. C.; PADILHA, L. C.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M.
32 Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com
33 progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina Ciências Agrárias**, v. 31, p. 163-172,
34 2010.

- 1
2 BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in
3 bovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, p. 141-152, 1990.
4
- 5 BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A. Ovarian follicular dynamics
6 during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, p. 1531-1547,
7 1997.
8
- 9 BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas
10 taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 205- 211, 2007.
11
- 12 BAVISTER, B. D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, v. 124, p. 181-196,
13 2002.
14
- 15 BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Mecanismos endócrinos e moleculares
16 envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian**
17 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n.6, 2006.
18
- 19 BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A. J. W. Estrogens inhibit and androgens enhance
20 ovarian granulosa-cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 133, p. 2204-2212, 1993.
21
- 22 BRACKETT, R. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS
23 DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of**
24 **Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.
25
- 26 BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis*
27 *catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.
28
- 29 BURATINI Jr., J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista**
30 **Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.190-196, 2007.
31
- 32 CAETANO; CAETANO, Jr. Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas. **PubVet**, v.
33 9, p. 381-393, 2015.
34

- 1 CAROU, M. C.; LOMBARDO, D. M.; CRUZANS, P. R.; MARURI, A.; FARINA, M. G.;
2 FIORITO, C. D.; OLEA, G. Apoptosis of bovine granulosa cells: Intercellular pathways and
3 differentiation. **Acta Histochemics**, p. 462-470, 2017.
4
- 5 CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; COLOMBO, A. H. B.;
6 ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P.; RIGOLON, L. P. Improvement of bovine *in vitro*
7 embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up.
8 **Theriogenology**, v. 57, p. 70-117, 2018.
9
- 10 CHOWDHURY, I.; THOMAS, K.; THOMPSON, W. E. Prohibitin (PHB) roles in granulosa
11 cell physiology: Review. **Cell and Tissue Research**, v. 363, p. 119-29, 2016.
12
- 13 CRAN, D. G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal**
14 **Reproduction Fertility Supplement**, n. 38, p. 49-62, 1989.
15
- 16 EDWARDS, R. G. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. **Nature**, v. 196, p. 446-450,
17 1962.
18
- 19 EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human
20 ovarian oocytes. **Nature**, v. 196, p. 349-351, 1965.
21
- 22 FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum
23 during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.
24
- 25 FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular
26 dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.
27
- 28 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A; SILVA, J. R. V.
29 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. *In*: GONÇALVES, P. B.
30 D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.
31 ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 227-327.
32

- 1 FILION, F.; BOUCHARD, N.; GOFF, A. K. Molecular cloning and induction of bovine
2 prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *in vivo*.
3 **Journal of Biology and Chemistry**, v. 276, p. 34323-34330, 2001.
4
- 5 FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in
6 process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469, p. 197-235, 2000.
7
- 8 FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm
9 capacitation required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in*
10 *vitro*. **Developmental Biology**, v. 128, p. 453-463, 1988.
11
- 12 FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of**
13 **Reproduction**, v.50, p.225-32, 1994.
14
- 15 FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A. C. O. Differentiation of dominant versus
16 subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.
17
- 18 GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Journal of Reproduction**
19 **Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.
20
- 21 GIMENES, L.U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.;
22 MESQUITA, L. G.; AS FILHO, M. F. The interval between the emergence of
23 pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not
24 significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus*
25 *bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, p. 385-393, 2015.
26
- 27 GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events
28 in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction**
29 **and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.
30
- 31 GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. Selection of the dominant follicle in
32 cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
33

- 1 GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle selection in monovular species.
2 **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.
- 3
- 4 GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle
5 deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239–257,
6 2003.
- 7
- 8 GONSALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de
9 embriões. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas**
10 **aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, SP: Varela, 2002. p. 195-226.
- 11
- 12 GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: Gordon, I. **Laboratory Production of**
13 **Cattle Embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.
- 14
- 15 HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and
16 metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 113-128, 2007.
- 17
- 18 HENDRIKSEN, P. J.; VOS, P. L.; STEENWEG, W. N.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.
19 Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes.
20 **Theriogenology**, v. 53, p. 11–20, 2000.
- 21
- 22 HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Discovering new hormones, receptors, and signaling mediators in
23 the genomic era. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 591-604, 2000.
- 24
- 25 HUGHES M. H.; GOROSPE W. C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell
26 death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.
27 **Endocrinology**, v. 129, p. 2415-2422, 1991.
- 28
- 29 HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocytes
30 maturation in superovulated cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 645-656,
31 1986.
- 32

- 1 IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of Predicting Stages of
2 Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. **Journal Dairy Science**,
3 v. 63, p. 155-160, 1980.
4
- 5 IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction
6 and Fertility**, v. 34, p. 39-54, 1987
7
- 8 JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and
9 fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 1-5, 2004.
10
- 11 KAIPIA, A.; HSUEH, A. J. Regulation of ovarian follicle atresia. **Annual Review of
12 Physiology**, v. 59, p. 349-363, 1997.
13
- 14 KASSENS, A.; HELD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.;
15 TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT)
16 of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of
17 healthy calves. **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 1-14, 2015.
18
- 19 LIM, J. M.; REGGIO, B. C.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. Development of *in vitro* derived
20 bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Human
21 Reproduction**, v. 14, p. 458-464, 1999.
22
- 23 LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P. M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural
24 modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or
25 butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 369-378, 2003.
26
- 27 LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W.
28 Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p.
29 3615-26, 1992.
30
- 31 MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; PETELIKOVA, J.; DVORACEK, V. Developmental
32 competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous
33 cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801-810, 1996.
34

- 1 MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental
2 competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in*
3 *vitro* embryo production. *Theriogenology*, v. 61, p. 329–335, 2004.
- 4
- 5 MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAÚJO, V. R. Papel do hormônio folículo
6 estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,
7 v. 33, p. 171-182, 2009.
- 8
- 9 MARKSTROM, E.; SVENSSON, E.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival
10 factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**,
11 v. 123, p. 23-30, 2002.
- 12
- 13 MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKUNA, S. Follicular Growth and Atresia in
14 Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **Journal of**
15 **Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.
- 16
- 17 MEINECKE, B.; JANAUS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1
18 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition.
19 **Reproduction Domestic Animals**, v. 36, p. 183-188, 2001.
- 20
- 21 MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Aspectos da
22 dinâmica folicular em bovinos. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 10, p.
23 01-06, 2014.
- 24
- 25 MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H.
26 B. *In vitro* embryo production in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p.
27 58-64, 2016.
- 28
- 29 MELO, C. L. *Dinâmica folicular de vacas de corte tratadas com três protocolos de*
30 *sincronização da ovulação*. 2009. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –
31 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
32 Alegre, RS, 2009.
- 33

- 1 MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental
2 competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture
3 by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**,
4 v. 55, p. 89-95, 2000.
- 5
- 6 MIHM, M.; BAKER, P.J.; IRELAND, J.L. Molecular evidence that growth of dominant
7 follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in
8 luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 1051-1059,
9 2006.
- 10
- 11 MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Tópicos**
12 **Avançados em Biotecnologia da Reprodução**. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.
- 13
- 14 MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONSALVES, P. B. D. Controle do estro e da
15 ovulação em bovinos e ovinos. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas**
16 **Aplicadas à Reprodução Animal**, Sao Paulo: Livraria Varela, 2001.
17 cap.3, p.25-55.
- 18
- 19 MORITA Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental**
20 **Biology**, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999
- 21
- 22 MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; SIQUEIRA, E. R.;
23 LISBOA, L. A.; SENEDA, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a largescale
24 IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus*
25 cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 696-701, 2014.
- 26
- 27 MOROTTI, F.; SANTOS, G. M. G.; JUNIOR, C. K.; SILVA-SANTOS, K. C.; ROSO, V. M.;
28 SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in
29 beef heifers. **Theriogenology**, v. 91, p. 21-26, 2017.
- 30
- 31 PETERS, R. M. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and
32 sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 415-421, 1992.
- 33

- 1 PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR; J. C.; UVO,
2 S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison
3 of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore
4 (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-697, 2009.
5
- 6 PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.;
7 SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F.
8 A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and
9 pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed
10 sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010.
11
- 12 PONTES, J. H. F.; MELO-STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES,
13 B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and
14 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
15 donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.
16
- 17 RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 1077-10 92,
18 1983.
19
- 20 SALES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista**
21 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 185-194, 2010.
22
- 23 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Bophysica Acta**,
24 p.1896-1912, 2012.
25
- 26 SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.
27 Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of**
28 **Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.
29
- 30 SARTORI, R.; PURSLEY, J. R. ; WILTBANK, M. C. **Estrous cycle of heifers and**
31 **lactating dairy cows: Ovarian and hormonal dynamics and estrous cycle abnormalities.**
32 Large Dairy Herd Management 3ed. American Dairy Science Association, 2017. CD ROOM.
33

- 1 SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 157, p.
2 29-38, 1981.
- 3
- 4 SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**,
5 v. 167, p. 205-218, 1991.
- 6
- 7 SCHULTZ, R.M.; DAVIS, W. Jr.; STEIN, P.; SVOBODA, P. Reprogramming of gene
8 expression during preimplantation development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 15, p.
9 276-282, 1999.
- 10
- 11 SHIDU, K. S.; GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome
12 reaction of mammalian spermatozoa. **International Review of Cytology**, v. 118, p. 231-280,
13 1989.
- 14
- 15 SIRARD, M. A.; LAMBERT, R. D. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by
16 laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 487-494, 1985.
- 17
- 18 SIRARD, M. A.; LAMBERT, R. D.; GRAY, P. *In vitro* development of *in vitro* fertilized
19 bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p.
20 21-29, 1986.
- 21
- 22 SIRARD, M.A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.;
23 SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for
24 meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.
- 25
- 26 STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.
27 2, p. 366, 1978.
- 28
- 29 STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.;
30 HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine
31 triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with
32 morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture.
33 **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.
- 34

- 1 TAKAHASHI, Y.; FIRST, L. N. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence
2 of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v. 37, p. 963-978,
3 1992.
- 4
- 5 TECNOPEC, 2008. Manual técnico sobre Sincronização e inseminação Artificial em tempo
6 fixo (IATF) em bovinos 2008. Disponível em:
7 <http://www.tecnopec.com.br/filearchive/a167eba757262f3b722a9b7c9f8fbfb9.pdf>. Acesso:
8 07/01/2019.
- 9
- 10 TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E. Successful culture *in vitro* sheep
11 and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497, 1972.
- 12
- 13 TILLY J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 20 162-172,
14 1996.
- 15
- 16 VAGARO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Bovine *in vitro* embryo
17 production: state of art and perspective of a constant evolution technique. **Revista Brasileira**
18 **de Reprodução Animal**, v. 32, p. 100-109, 2008.
- 19
- 20 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
21 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717- 1751,
22 2005.
- 23
- 24 VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em
25 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, v. 51, p. 6-10, 2012.
- 26
- 27 VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Estradiol-17 beta has a biphasic effect on oxytocin secretion
28 by bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1404-1449, 1993.
- 29
- 30 WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor
31 (MPF) and mitogen- activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro*
32 maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the
33 meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 175-184, 2001.
- 34

1 WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory
2 conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

3
4 WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian and follicle quality on
5 morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal**
6 **Animal Science**, v.78, p.1277-83, 2000.

7
8 WONG, R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental &**
9 **Clinical Cancer Research**, p. 30-87, 2011.

10
11 WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.;
12 NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro*
13 procedures and their implications for development. **Reproduction Fertility and**
14 **Development**, v. 17, p. 23-35, 2005.

15
16 YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, I. J. (Ed.) **The**
17 **physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven, 1994. p.189-317.

18
19 YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K. Influence of oxygen
20 tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.
21 59, p. 1585-1596, 2003.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 3 OBJETIVOS

2

3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Determinar o melhor momento da onda de crescimento folicular para a
6 recuperação de oócitos em ovários de abatedouro, visando um incremento na taxa de
7 produção embrionária *in vitro*.

8

9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

11 - Criar e estabelecer um padrão de avaliação dos pares ovarianos que
12 correlacione a presença de estruturas ovarianas (corpo lúteo e folículo dominante) com o
13 momento da onda de crescimento folicular;

14

15 - Comparar as taxas de clivagem e blastocisto obtidas a partir de oócitos
16 provenientes de pares ovarianos com corpo lúteo inicial e ausência de folículo dominante
17 (grupo 1), com corpo lúteo e ausência do folículo dominante (grupo 2), com corpo lúteo
18 inicial e a presença do folículo dominante (grupo 3), e com corpo lúteo e presença do folículo
19 dominante (grupo 4).

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR EM OVÁRIOS DE ABATEDOURO SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

INFLUENCE OF FOLLICULAR GROWTH WAVE MOMENT ON SLAUGHTER OVARIES ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar qual o impacto do momento da onda de crescimento folicular sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. Para isto, ovários de fêmeas *Bos indicus* (N = 196) foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em recipiente térmico contendo solução de NaCl 0,9% aquecida a temperatura de 36°C. Em seguida, no laboratório, foi realizada a avaliação de cada par de ovários individualmente. As estruturas analisadas foram os folículos, quanto à ocorrência ou não da divergência folicular (sendo considerado folículo dominante – FD - aquele ≥ 6 mm), e o corpo lúteo (CL), quanto à sua presença/ausência e estágio de desenvolvimento. Posteriormente, os pares ovarianos (N = 196) foram alocados entre os seguintes grupos experimentais: G1 – CL inicial e ausência de folículo dominante; G2 – CL e ausência de folículo dominante; G3 – CL inicial e presença de folículo dominante; G4- CL e presença de folículo dominante. O grupo controle não passou por avaliação e classificação, todos os ovários foram aspirados aleatoriamente (n= 13 pares). Os oócitos foram recuperados por aspiração folicular, em seguida foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*, cada grupo individualmente. As taxas de clivagem e blastocisto foram analisadas por teste de regressão logística binária ($P \leq 0,05$). A taxa de clivagem obtida, em ordem decrescente entre os grupos, foi de 50,22% para o grupo G4 (CL e presença de FD); 45,65% grupo G3 (CL inicial e presença de FD); 44,06% grupo G2 (CL e ausência de FD); 36,23% grupo Controle e 35,19% grupo G1 (CL inicial e ausência de FD). Por outro lado, a melhor taxa de blastocisto obtida em D7 foi de 37,62% pertencente ao grupo G2; seguida por 29,62% referente ao grupo G1 e 26,81% do grupo controle; sendo que as menores taxas de blastocisto foram dos grupos G4 e G3; 10,09% e 9,24%, respectivamente. Como conclusão, podemos sugerir que a seleção pós abate de pares ovarianos com a presença de corpo lúteo funcional associada à ausência de folículo dominante proporciona a recuperação de oócitos com maior competência para a produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: PIVE; Onda de crescimento folicular; *Bos indicus*, Ciclo estral.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the impact of follicular growth wave moment on the *in vitro* production of bovine embryos. For this, ovaries of *Bos indicus* females (N = 196) were collected in the local slaughterhouse and transported to the laboratory in a thermostatic container containing NaCl 0,9% solution heated to 36 ° C. Then, in the laboratory, the evaluation of each pair of ovaries individually was performed. The structures analyzed were the follicles, whether or not follicular divergence was considered (dominant follicle - FD - that ≥ 6 mm), and the corpus luteum (CL), in terms of their presence/absence and stage of development. Subsequently, ovarian pairs (N = 196) were allocated between the following experimental groups: initial G1 - CL and absence of dominant follicle; G2 - CL and absence of dominant follicle; G3 - initial CL and presence of dominant follicle; G4-CL and presence of dominant follicle. The control group did not undergo evaluation and classification, all ovaries were randomly aspirated (n = 13 pairs). The oocytes were recovered by follicular aspiration, then matured, fertilized and cultured *in vitro*, each group individually. The cleavage and blastocyst rates were analyzed per binary logistic regression test ($P \leq 0,05$). The cleavage rate obtained, in decreasing order among the groups, was 50.22% (229/456) for the G4 group (CL and presence of FD); 45.65% (252/552) G3 group (initial CL and presence of FD); 44.06% (89/202) G2 group (CL and absence of FD); 36.23% (50/138) Control group and 35.19% (120/341) G1 group (initial CL and absence of FD; $P < 0,0001$). On the other hand, the best blastocyst rate obtained in D7 was 37.62% (76/202) belonging to the G2 group; followed by 29.62% (101/341) for the G1 group and 26.81% (37/138) for the Control group; with the lowest rates of blastocyst being in groups G4 and G3; 10.09% (46/456) and 9.24% (51/552), respectively ($P < 0,0001$). As a conclusion, we can suggest that follicular aspiration after the slaughter of ovarian pairs with the presence of functional corpus luteum associated with the absence of dominant follicle provides the recovery of oocytes with higher quality and increase in the results of *in vitro* production of embryos.

Key words: IVPE; Follicular growth wave; *Bos indicus*; Estrous cycle.

4.1 INTRODUÇÃO

O aumento da eficiência produtiva na pecuária tem sido possível devido ao uso das biotécnicas da reprodução, as quais têm possibilitado avanços no melhoramento genético e desempenho reprodutivo dos planteis (HANSEN, 2014). Na última década houve uma ascensão mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE), chegando a ser produzido um total de 666.215 embriões somente no ano de 2016 (VIANA, 2012; WATANABE et al., 2017; PERRY, 2017).

No entanto, apesar da consolidação do uso desta biotécnica em larga escala, a taxa de produção embrionária ao final do procedimento permanece na média de 30 a 40% (GALLI et al., 2014; LONERGAN et al., 2016). É importante considerar que a capacidade oocitária para a fecundação e desenvolvimento *in vitro* é inferior ao desempenho obtido na fêmea *in vivo* (BLONDIN et al., 2002). Isto porque, o momento da onda de crescimento folicular durante a recuperação dos oócitos exerce influência sobre a qualidade dos mesmos, visto que a competência oocitária é adquirida gradualmente com o desenvolvimento folicular (SIRARD et al., 1999).

Durante a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum pick up*; OPU) é possível recuperar oócitos em dias aleatórios do ciclo estral, ou seja, folículos que se encontram em diferentes estágios do desenvolvimento (WIT et al., 2000). Nestas condições, mais de 85% dos folículos ovarianos aspirados apresentam algum grau de atresia devido ao processo de apoptose (HENDRIKSEN et al., 2000). A ocorrência da divergência folicular e o estabelecimento de um folículo dominante durante a onda causam o bloqueio no desenvolvimento dos folículos subordinados levando a regressão dos mesmos (GINTHER et al., 2003). Além disso, as fêmeas bovinas apresentam em média três ondas de crescimento folicular por ciclo estral e somente na última a luteólise permitirá os pulsos adequados de LH para que ocorra a ovulação (MORAES, et al., 2001).

Neste contexto, algumas estruturas ovarianas podem auxiliar na identificação do melhor momento para recuperação dos oócitos de boa qualidade. O folículo ovariano, por exemplo, é formado durante a embriogênese e se desenvolve somente após a puberdade por meio da atuação de fatores endócrinos e parácrinos, tendo por função fornecer um ambiente adequado para o crescimento e maturação do oócito (MCGEE e HSUEH, 2008; FIGUEIREDO et al., 2008). Ao longo de cada onda os folículos passam pelas fases de recrutamento, seleção, dominância até chegar à ovulação. Estes períodos são regulados por fatores hormonais como o FSH, LH, estradiol, progesterona, e por outros fatores de

1 crescimento (DRIANCOURT et al., 2000). Desta forma, a viabilidade e competência oocitária
2 para o desenvolvimento *in vitro* é afetada por fatores como o dia do ciclo estral, presença do
3 folículo dominante e níveis de atresia folicular (PIRESTANI et al., 2011; PENITENTE-
4 FILHO et al., 2014; MELLO et al., 2016).

5 O corpo lúteo, por sua vez, é formado após a ocorrência da ovulação e por
6 isso pode ser considerado um indicador do estágio reprodutivo da fêmea (PENITENTE-
7 FILHO et al., 2014). É importante considerar que o CL sofre uma dinâmica mudança
8 estrutural e funcional ao longo do ciclo. Estudos demonstram que há um aumento seguido de
9 regressão do CL em relação ao seu tamanho e capacidade de secretar progesterona ao longo
10 do ciclo estral (FIELD e FIELD, 1996). Portanto, a presença do CL no ovário tem se
11 mostrado um critério de seleção para a recuperação de oócitos em bovinos, uma vez que tal
12 estrutura está envolvida na manutenção da gestação e regulação do ciclo estral (PENITENTE-
13 FILHO et al., 2014; HAJARIAN et al., 2016).

14 Neste contexto, há indícios de que os folículos e o corpo lúteo são estruturas
15 ovarianas que interferem na aquisição da competência oocitária. Além disso, a sincronização
16 da onda folicular anterior à sessão de OPU tem demonstrado efeitos positivos sobre a PIVE,
17 melhorando a taxa de produção embrionária (45,8% para fêmeas sincronizadas vs. 38,5% para
18 fêmeas não sincronizadas; $P = 0,001$; CAVALIERI et al., 2018). Porém, não basta somente
19 sincronizar a onda, também é necessário conhecer o melhor momento para a recuperação dos
20 oócitos de boa qualidade. Neste contexto, a alta oferta de ovários de abatedouro surge como
21 oportunidade para investigações na área da pesquisa básica que possam tornar o uso dos
22 protocolos de sincronização da onda folicular realmente viável nas doadoras submetidas à
23 OPU.

24 Tendo em vista as relações acima citadas, o presente estudo tem como
25 objetivo estabelecer uma relação entre as estruturas foliculares e luteínicas ovarianas com a
26 fase do ciclo estral das doadoras *Bos indicus*, para assim melhor compreender qual o impacto
27 do momento da onda de crescimento folicular sobre o desempenho da PIVE. Desta forma,
28 propor o momento ideal para a recuperação de oócitos, possibilitando o uso racional da
29 aspiração folicular, seja por OPU ou em ovários de abatedouro.

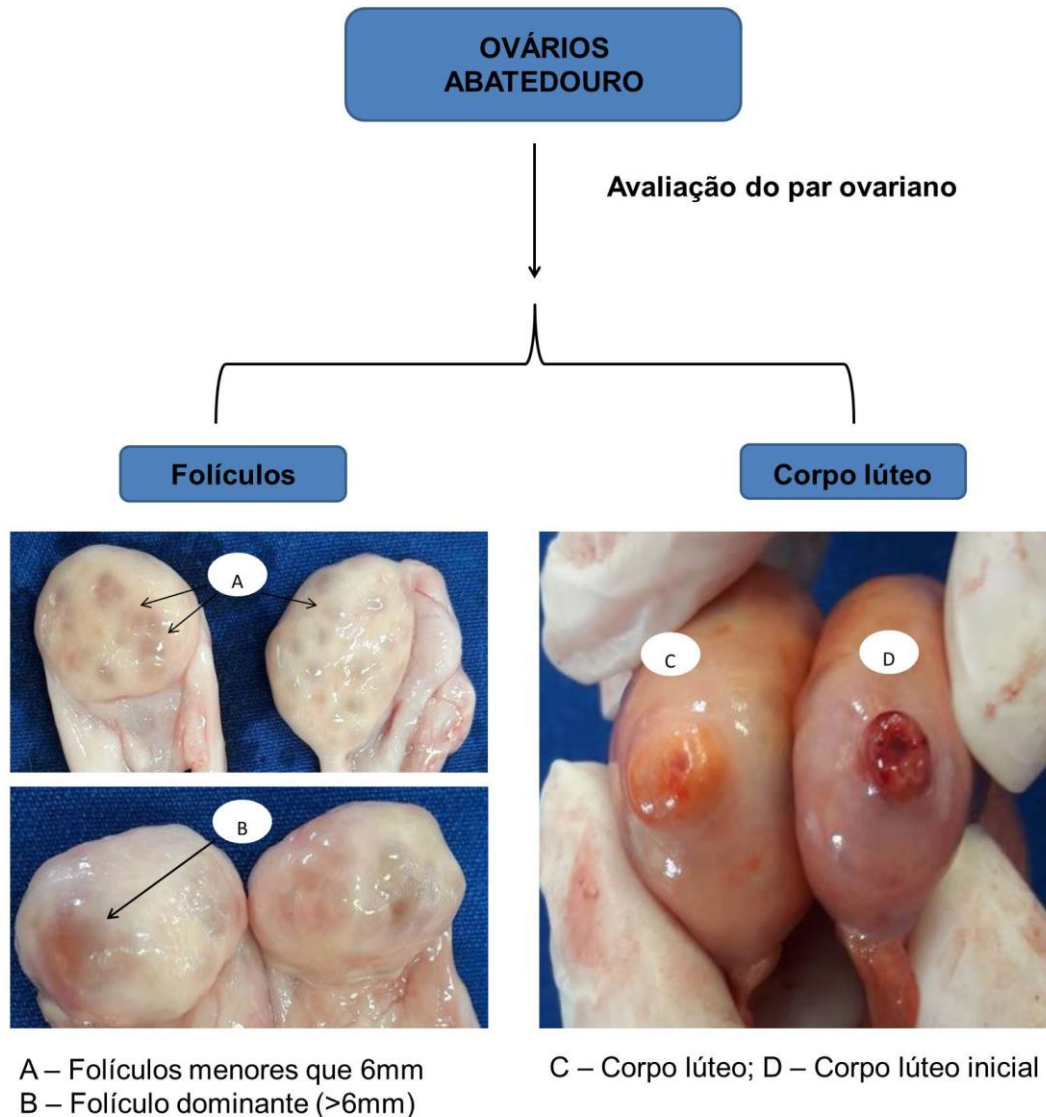
30 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

31 5.2.1 Classificação dos Pares Ovarianos de Acordo com o Momento da Onda Folicular

1 Ovários de fêmeas *Bos indicus* (N = 196) foram coletados em abatedouro
 2 local e transportados ao laboratório em recipiente térmico contendo solução de NaCl 0,9%
 3 aquecida a temperatura de 36°C. No laboratório foi realizada a avaliação de cada par de
 4 ovários individualmente, onde a manipulação ocorreu com os ovários dentro do becker
 5 contendo solução NaCl 0,9% aquecida à mesma temperatura de transporte, em tempo menor
 6 que 30 segundos para que não houvesse o comprometimento da qualidade oocitária.

7 As estruturas analisadas estão representadas na Figura 3, sendo os folículos
 8 avaliados quanto à ocorrência ou não da divergência folicular, foi considerado folículo
 9 dominante aquele maior ou igual a 6 mm (SARTORI et al., 2016; Figura 4), e o corpo lúteo
 10 avaliado quanto à sua presença/ausência e estágio de desenvolvimento.

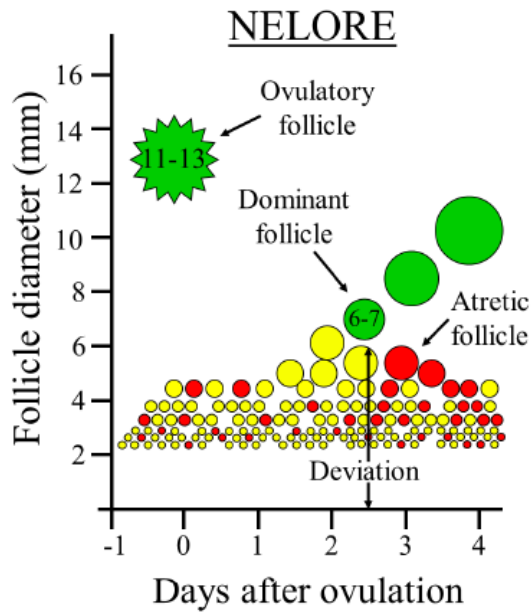
11
 12 **Figura 3** – Esquema da metodologia utilizada para avaliação das estruturas ovarianas.



13

14 **Fonte:** Autor.

1 **Figura 4** – Caracterização do diâmetro folicular no momento do desvio em fêmeas da raça
 2 Nelore.



3

4 **Fonte:** Sartori et al., 2016.

5

6 Para a classificação dos pares ovarianos segundo a fase do ciclo estral
 7 utilizou-se as características de aparência do corpo lúteo propostas no Quadro 1.

8

9 **Quadro 1** - Precisão dos estágios de previsão do ciclo estral bovino pela aparência bruta do
 10 corpo lúteo.

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO	DIAS DO CICLO ESTRAL	CARACTERÍSTICAS OVARIANAS
Estágio I	1 a 4 dias	Intervalo da ovulação e crescimento do epitélio a ponto da ruptura do folículo e formação do Corpo lúteo
Estágio II	5 a 10 dias	Corpo lúteo de cor vermelha/marrom e vascularização periférica

Estágio III	11 a 17 dias	Corpo lúteo laranja/ amarelo e vascularização do ápice
Estágio IV	18 a 20 dias	Corpo lúteo regredindo sem vascularização e presença de folículo dominante

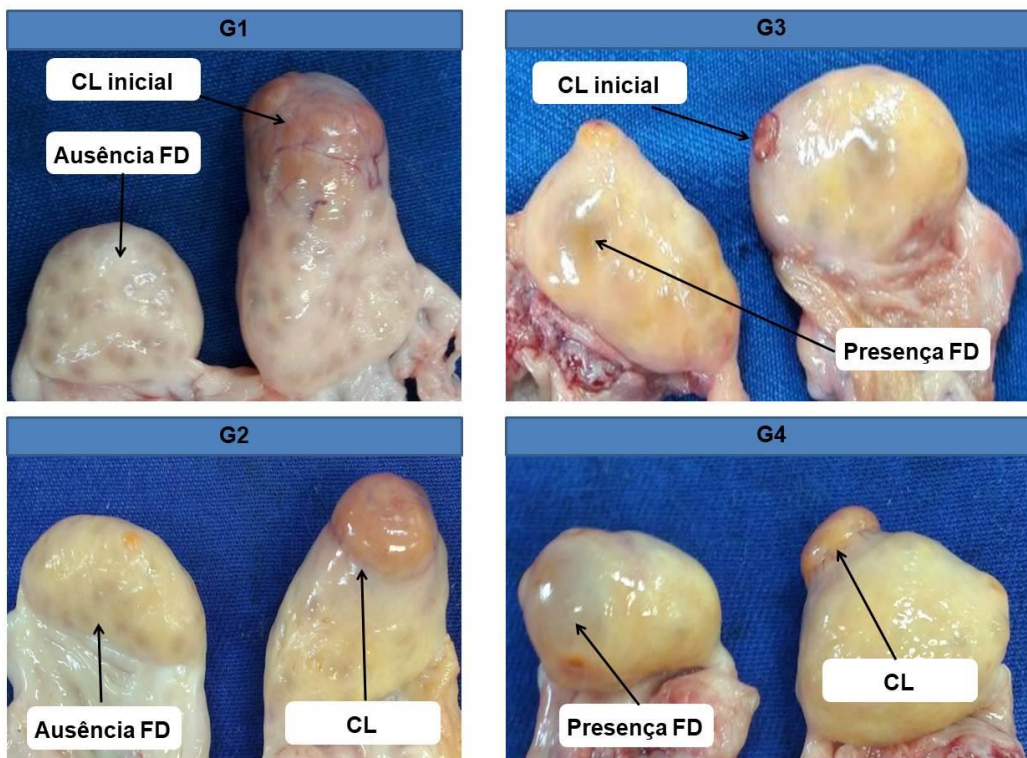
1 **Fonte:** Ireland et al., 1980 . Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross
2 Appearance of the Corpus Luteum.

3

4 No presente estudo, foram consideradas somente as estruturas luteínicas
5 classificadas nos estágios II e III de desenvolvimento. Posteriormente, os pares ovarianos (N
6 = 196) foram alocados entre os grupos experimentais representados na Figura 5.

7

8 **Figura 5** – Grupos experimentais de acordo com as características das estruturas ovarianas
9 (Corpo lúteo e Folículos).



10

11 CL = Corpo lúteo; FD = Folículo dominante; G1: presença de CL inicial (estágio II) e
12 ausência do FD (≥ 6 mm); G2: presença de CL (estágio III) e ausência de folículo dominante

1 (≥ 6 mm); G3: presença de CL inicial (estágio II) e presença de FD (≥ 6 mm); G4: presença de
2 CL (estágio III) e presença de FD (≥ 6 mm); **Fonte:** Autor.

3
4 Como controle, foram produzidos embriões a partir de pares de ovários
5 aspirados aleatoriamente (n= 13 pares), ou seja, sem prévia avaliação e classificação ovariana
6 em um dos grupos experimentais estabelecidos.

7 8 4.2.2 Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

9 10 4.2.2.1 Maturação *in vitro* (MIV)

11 Os folículos antrais ovarianos foram aspirados com agulha hipodérmica 21-
12 gauges (30x8 mm) acoplada a seringa de 10 mL para a recuperação dos COC's, cada grupo
13 experimental foi trabalhado individualmente. Em seguida, os COC's grau I, II e III de
14 qualidade (SENEDA et al., 2001) foram submetidos à maturação *in vitro*, por um período de
15 22 a 26 horas em 100 μ L de meio de maturação, temperatura de 38.5°C, atmosfera de 5% de
16 CO₂, em ar e umidade saturada. O meio de maturação utilizado é composto por TCM-199
17 bicarbonato, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 5 μ g de hormônio
18 luteinizante, 0,5 μ g de hormônio folículo estimulante, 1 μ g de estradiol, 2,2 μ g de piruvato e
19 50 μ g de gentamicina/mL de meio (Meio de Maturação, In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim,
20 SP, Brasil).

21 22 4.2.2.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

23
24 Os COC's maturados foram lavados em meio TCM-199 tamponado com
25 HEPES e realocados em gotas de 100 μ L do meio de fecundação, composto por Tris-buffered
26 medium (TBM) suplementado com 8 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos
27 graxos e 1 mM de glutamina (Meio de Fertilização, In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP,
28 Brasil) e cobertas por óleo mineral. Para a fecundação, o sêmen de um único touro
29 previamente testado foi descongelado à temperatura de 36° C por um tempo de 30 segundos e
30 selecionado por gradiente de Percoll (PARRISH et al., 1995). Posteriormente, cada gota do
31 meio de fecundação contendo os COC's maturados (mínimo 10 e máximo 30 oócitos por
32 gota) foi fecundada com 3 mL de sêmen (concentração espermática final ajustada para 1×10^6
33 spz vivos/gota), então, os gametas foram incubadas por um período de 20 a 24 horas à

1 temperatura de 38.5° C, tensão atmosférica 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O dia da
2 fecundação foi considerado como o dia zero (D0) do protocolo.

3 4 4.2.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

5
6 Os prováveis zigotos foram desnudados com movimentos de pipetagens,
7 lavados em meio TCM-199 tamponado com HEPES e cultivados *in vitro* por um período de
8 sete dias em meio SOF (Synthetic oviduct fluid; In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP, Brasil)
9 suplementado com 8 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, sob óleo mineral, a 38.5° C, com
10 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

11 No terceiro dia de cultivo (D3) foi realizada a substituição de 50% do
12 volume de cada gota por meio SOF novo (1° feeding), além disso, foi feita a avaliação da taxa
13 de clivagem para cada grupo experimental. No quinto dia de cultivo (D5) realizou-se
14 novamente a substituição de 50% do volume de cada gota por meio SOF novo, desta vez,
15 suplementado com glicose (2° feeding). No sétimo dia (D7) os embriões foram avaliados
16 quanto à taxa de blastocisto.

17 18 4.2.3 Análise Estatística

19
20 O efeito da presença de estruturas ovarianas no momento da aspiração
21 folicular ovariana foi analisado por um modelo de regressão logística binária, incluindo a
22 presença de CL inicial / CL, associados ou não com a presença do folículo dominante, como
23 variáveis fixas no modelo. Na presença de um efeito significativo, as taxas de clivagem e de
24 blastocisto foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado para o ranking dos tratamentos.
25 Para análise descritiva, os dados estão apresentados como porcentagem (%). Todas as análises
26 estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. O nível de
27 significância para rejeitar H₀ foi de 5%, portanto, foi considerado valor de $p \leq 0,05$ para
28 indicar um efeito das variáveis categóricas e suas interações. Valor de $p < 0,10$ foi
29 considerado como tendência estatística.

30 31 4.3 RESULTADOS

32
33 A presença das estruturas ovarianas (CL inicial ou CL, associados ou não
34 com a presença do folículo dominante) no momento da aspiração folicular ovariana

1 determinou um efeito significativo ($P < 0,0001$) sobre as taxas de clivagem e de blastocisto.
2 Desta maneira, o número de COC's recuperados pela aspiração folicular ovariana, assim
3 como as taxas de clivagem e blastocisto para cada grupo estão descritos na Tabela 1.

4 No terceiro dia de cultivo (D3), a taxa de clivagem obtida, em ordem
5 decrescente entre os grupos, foi de 50,22% para o grupo G4 (CL e presença de FD); 45,65%
6 grupo G3 (CL inicial e presença de FD); 44,06% grupo G2 (CL e ausência de FD); 36,23%
7 grupo Controle e 35,19% grupo G1 (CL inicial e ausência de FD).

8 Por outro lado, a maior taxa de blastocisto obtida em D7 foi de 37,62%
9 pertencente ao grupo G2; seguida por 29,62% referente ao grupo G1 e 26,81% do grupo
10 controle; sendo que as menores taxas de blastocisto foram dos grupos G4 e G3; 10,09% e
11 9,24%, respectivamente ($P < 0,0001$).

12 Considerando o efeito isolado da presença do folículo dominante no
13 momento da aspiração, houve um efeito significativo para variação na taxa de blastocisto ($P <$
14 $0,05$), como demonstrado na Figura 6. No entanto, ao avaliar o efeito isolado do corpo lúteo
15 foi observado que o grupo controle apresentou melhor desempenho que todos os outros
16 grupos com CL e dentro destes, não houve diferença na taxa de blastocisto (26,81% Controle;
17 17,02% CL inicial; 18,54% CL; $P = 0,067$), como demonstrado na Figura 7.

18 19 4.4 DISCUSSÃO

20
21 Em animais *Bos indicus*, foi possível observar que as taxas de produção
22 embrionária *in vitro* foram influenciadas pela presença das estruturas ovarianas (CL inicial ou
23 CL, associados ou não com a presença do folículo dominante) no momento da aspiração
24 folicular (Tabela 1). Sendo assim, no presente estudo os pares ovarianos que apresentaram
25 corpo lúteo na fase funcional juntamente com a ausência de um folículo dominante (grupo
26 G2) foram os que obtiveram maior taxa de produção *in vitro* de embriões. Isso demonstra o
27 benefício de selecionar ovários com tais características para a aspiração folicular e aumento
28 da eficiência da PIVE.

29 Com base nos estágios de previsão do ciclo estral bovino pela aparência do
30 corpo lúteo proposto por Ireland et al. (1980), acredita-se que os ovários do grupo G2 (CL e
31 ausência de FD) foram provenientes de fêmeas que se encontravam aproximadamente no 11º
32 dia do ciclo estral (Figura 8). Neste momento o corpo lúteo atinge seu maior tamanho e
33 desempenha sua função secretória da maneira mais eficiente, mantendo altos níveis de
34 progesterona. Além disso, fisiologicamente, uma fêmea *Bos indicus* estará em sua segunda

1 onda de crescimento folicular, mais especificamente em um momento antecedente ao desvio
2 folicular. Desta forma, pressupõe-se que os oócitos recuperados por aspiração dos ovários e
3 destinados à produção *in vitro* de embriões foram provenientes de folículos que ainda não
4 haviam recebido nenhum estímulo apoptótico, por isso apresentaram boa competência em
5 serem fecundados e desenvolver-se em embriões.

6 Em seguida, os ovários que não apresentaram folículo dominante mas que
7 continham corpo lúteo na fase inicial (grupo G1) foram os que obtiveram a segunda maior
8 produção de embriões *in vitro*. Tal ocorrência pode ser atribuída às fêmeas que estavam
9 aproximadamente no 5º dia do ciclo estral, isto é, previamente ao desvio da primeira onda de
10 crescimento folicular.

11 Em contrapartida, os ovários que apresentaram corpo lúteo nas fases
12 funcional e inicial com a presença do folículo dominante, foram os que menos produziram
13 embriões, respectivamente, obtendo taxas inferiores ao grupo controle. Isto porque, os ovários
14 do grupo G4 (presença de CL e FD) provavelmente pertenceram a fêmeas que estavam perto
15 do 17º dia do ciclo estral, momento em que já havia ocorrido a divergência da terceira e
16 última onda de crescimento folicular e os folículos subordinados haviam recebido o estímulo
17 para apoptose, acarretando no menor desempenho oocitário para a produção embrionária *in*
18 *vitro*. Da mesma forma, acredita-se que os ovários do grupo G3 (presença de CL inicial e FD),
19 sejam oriundos de fêmeas que já haviam passado pela divergência da primeira onda de
20 crescimento folicular e estavam por volta do 7º ao 10º dia do ciclo estral.

21 O maior resultado do grupo controle em relação aos obtidos a partir de
22 ovários com presença de folículo dominante (grupos G4 e G3) deve-se à inclusão de ovários
23 em todos os momentos da onda de crescimento folicular neste grupo. Assim, os oócitos com
24 baixa qualidade, provenientes de folículos atrésicos, foram somados aos oócitos de boa
25 qualidade, oriundos de folículos saudáveis, e destinados à produção *in vitro* de embriões.
26 Cabe ressaltar que em estudo anterior foi demonstrado que apesar de folículos em atresia
27 fornecerem oócitos grau III e IV, com baixa ou nenhuma competência para a PIVE, estes não
28 interferem no desenvolvimento dos oócitos grau I e II oriundos de folículos saudáveis, quando
29 colocados em conjunto para a maturação (ZEUNER et al., 2003).

30 Em ovários de fêmeas sincronizadas anteriormente ao abate, os oócitos
31 recuperados entre os dias 14 a 16 do ciclo estral apresentaram melhor competência para o
32 desenvolvimento embrionário *in vitro* quando comparados aqueles aspirados entre os dias 7 à
33 9, (24,3% x 13,0% $P < 0,05$, respectivamente; MACHATKOVA et al., 1996). Este resultado
34 converge para o encontrado no presente estudo, onde uma taxa inferior de produção

1 embrionária também foi obtida por oócitos provenientes dos ovários de fêmeas que estavam
2 aparentemente entre os 7º ao 10º dia do ciclo estral (grupo G3; 9,24% $P < 0,0001$).

3 Adicionalmente, ao investigar a interferência que as diferentes fases da onda
4 folicular (crescimento/ dominância) exercem sobre a qualidade do oócito incluso no folículo,
5 Hendriksen et al. (2000) descreveram um efeito negativo do folículo dominante na
6 competência oocitária dos folículos subordinados, assim como, Machatkova et al. (2004)
7 também relataram taxa de blastocisto significativamente superior com o uso de oócitos
8 aspirados na fase de crescimento folicular. Tais resultados corroboram com o do presente
9 estudo, pois ao analisar o efeito isolado da presença do folículo dominante no momento da
10 aspiração folicular sobre a taxa de blastocisto, os pares de ovários que não continham folículo
11 dominante produziram 26,75% de embriões, ao passo que aqueles com a presença dessa
12 estrutura produziram 11,82% ($P < 0,05$; Figura 6). De maneira geral, pode-se dizer que os
13 ovários com ausência de folículo dominante obtiveram um melhor desempenho na produção
14 *in vitro* de embriões quando comparados aos ovários em que estes estavam presentes.

15 Em relação ao efeito isolado da presença do corpo lúteo em suas diferentes
16 fases de desenvolvimento sobre a produção embrionária *in vitro*, não houve diferença na taxa
17 de blastocisto entre os grupos de ovários com CL inicial ou com CL. Além disso, o grupo
18 controle apresentou maior taxa de produção quando comparado aos demais grupos (17,02%
19 CL inicial; 18,54% CL; 26,81% Controle; $P = 0,067$; Figura 7).

20 No entanto, os estudos envolvendo o efeito do CL sobre a qualidade oocitária
21 e eficiência da PIVE apresentam dados controversos. Tem sido relatado que a presença do CL
22 no ovário traz vantagens para o número de oócitos recuperados, assim como na qualidade
23 dessas estruturas e número final de embriões produzidos (REIS et al., 2006). Por outro lado,
24 recentemente Santos et al. (2017) demonstraram que a taxa de recuperação, o número de
25 oócitos por ovário e a qualidade oocitária não são afetados pela presença do CL, tanto na OPU
26 quanto na aspiração de ovários *post mortem*, porém, a avaliação realizada pelo autor utilizou
27 somente critérios morfológicos e ensaio de azul cresil brilhante (ACB) para determinar a
28 competência oocitária.

29 Desta forma, novas investigações ainda são necessárias para esclarecer a real
30 interferência do corpo lúteo no desempenho oocitário para a produção de embrião. Com os
31 resultados obtidos até o momento pode-se propor que o corpo lúteo é um indicador do ciclo
32 estral também para fêmeas *Bos indicus*, apontando com boa precisão qual a onda de
33 crescimento folicular e o momento desta em que a doadora se encontra. Assim, a partir desta

1 informação pode-se chegar ao momento ideal para a recuperação de oócitos com maior
2 qualidade e competência, visando o incremento nos resultados da PIVE.

3 Apesar da taxa de blastocisto ter apontado com clareza a condição ovariana
4 mais indicada para a recuperação dos oócitos a serem destinados à PIVE, os resultados na
5 taxa de clivagem não foram tão claros. No terceiro dia do cultivo *in vitro*, não houve diferença
6 para as taxas de clivagem obtidas pelos grupos G4 (50,22% - CL e FD); G3 (45,65% - CL
7 inicial e FD) e G2 (44,06% - CL com ausência de FD). Além disso, as menores porcentagens
8 de prováveis zigotos foram do grupo Controle (36,23%) e G1 (35,19% - CL inicial com
9 ausência de FD), respectivamente ($P < 0,0001$). De maneira geral, pode-se observar que os
10 grupos com menor produção de blastocisto em D7 foram os que apresentaram maiores taxas
11 de clivagem em D3, a mesma relação vale para ao contrário.

12 É necessário ressaltar que apesar da taxa de clivagem designar a proporção
13 de oócitos que foram fecundados, ela não é um indicador preciso da produção final de
14 embriões. Isto porque, esta taxa é calculada durante a fase das primeiras divisões celulares, na
15 qual ocorre a ativação genômica do embrião. A transição do genoma materno-embriônico é
16 um momento crítico para o zigoto que poderá continuar seu desenvolvimento / ou não de
17 acordo com sua competência. Além disso, o tempo para o desenvolvimento difere entre as
18 estruturas de acordo com a capacidade individual. Tais fatores podem ocasionar a variação
19 entre as taxas de clivagem e blastocisto (SARTORI e DODE, 2008).

20 Enfim, acredita-se que é possível fomentar os resultados da produção *in vitro*
21 de embriões e tornar esta biotécnica ainda mais eficiente. Recentemente, Cavalieri et al.
22 (2018) verificaram efeitos positivos da sincronização da emergência da onda folicular
23 ovariana sobre a PIVE. As doadoras que receberam o tratamento de sincronização pré-OPU
24 apresentaram maior número de embriões ($5,9 \pm 0,5 \times 4,5 \pm 0,4$; $P = 0,037$), maior taxa de
25 produção embrionária ($45,8\% \times 38,5\%$; $P = 0,001$) e maior média de concepções por grupo
26 ($2,2 \pm 0,2 \times 1,6 \pm 0,2$; $P = 0,07$) em relação às doadoras que não receberam tratamento
27 hormonal. Do mesmo modo, Goodhand et al. (1999) relataram maiores taxas de recuperação
28 oocitária e blastocisto com a realização da OPU a cada 3 à 4 dias em comparação a frequência
29 semanal, pois, desta forma é possível prevenir o estabelecimento de um folículo dominante.

30 Neste enquadramento, o presente estudo demonstrou a existência de um
31 momento da onda de crescimento folicular o qual é mais indicado à realização da aspiração
32 folicular para a recuperação de oócitos mais competentes. Desta forma é possível justificar a
33 sincronização da onda folicular como um método para direcionar a obtenção de oócitos
34 selecionados para a PIVE. Assim, o tratamento hormonal das doadoras antecedente à OPU ou

1 pré-abate torna-se uma alternativa viável (BACELAR et al., 2010; FERNANDES et al., 2014;
2 ONGARATTO et al., 2015).

3 Além disso, o padrão de avaliação dos pares ovarianos aqui proposto que
4 relacionou a presença de estruturas ovarianas (CL e FD) com o ciclo estral e o momento da
5 onda de crescimento folicular em fêmeas *Bos indicus* torna mais eficiente o uso de ovários
6 após o abate para os setores da pesquisa e comércio, possibilitando a obtenção dos melhores
7 oócitos a serem destinados para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

8 9 4.5 CONCLUSÃO

10
11 Pode-se concluir que a seleção pós abate de pares ovarianos com a presença
12 de corpo lúteo funcional associada à ausência de folículo dominante proporciona a
13 recuperação de oócitos com maior eficiência para a produção *in vitro* de embriões. Tais
14 características são referentes ao início da segunda onda de crescimento folicular do ciclo
15 estral, momento mais indicado para a aspiração folicular e para a obtenção de um acréscimo
16 nos resultados da PIVE. Vale ressaltar que novas investigações ainda são necessárias para o
17 aprimoramento e expansão dos métodos apresentados.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 REFERENCIA

2

3 BACELAR, D.; MAX, M. C.; PADILHA, L. C.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M.
4 Incremento na obtenção de oocitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com
5 progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina Ciências Agrárias**, v. 31, p. 163-172,
6 2010.

7

8 BARUSELLI, P. S.; MARQUES M. O.; NASSER, L. F.; REIS, E. L. Effect of eCG on
9 pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial
10 insemination. **Theriogenology**, v. 59, p. 214, 2003.

11

12 BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining
13 characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular**
14 **Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.

15

16 BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.A.
17 Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine
18 oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.

19

20 CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; COLOMBO, A. H. B.;
21 ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P.; RIGOLON, L. P. Improvement of bovine *in vitro*
22 embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up.
23 **Theriogenology**, v. 57, p. 70-117, 2018.

24

25 DRIANCOURT, M.A.; FEVRE, J.; MARTAL, J.; AL GUBORY, K.H. Control of ovarian
26 follicular growth and maturation during pregnancy in sheep by the corpus luteum and
27 placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 151-158, 2000.

28

29 FERNANDES, C. A. D. C; MIYAUCHI, T. M.; FIGUEIREDO, A. C. S. D.; PALHAO, M.
30 P.; VARAGO, F. C.; NOGUEIRA, E. S. C. Hormonal protocols for *in vitro* production of
31 Zebu and taurine embryos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p. 813-817, 2014.

32

33 FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum
34 during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

- 1
2 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V.
3 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. *In*: GONÇALVES, P. B.
4 D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.
5 ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 227-327.
6
7 GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up,
8 intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and
9 horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v. 81, p. 138-151,
10 2014.
11
12 GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle
13 deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239–257,
14 2003.
15
16 GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.;
17 BROADBENT, P. J. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine
18 donos aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51,
19 p. 951-961, 1999.
20
21 GREVE, T.; HYTTEL, P.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and
22 embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 41-50, 1995.
23
24 HAJARIAN, H.; SHAHSAVARI, M. H.; KARAMI-SHABANKAREH, H.; DASHTIZAD,
25 M. The presence of corpus luteum may have a negative impact on *in vitro* developmental
26 competency of bovine oocytes. **Reproductive Biology**, v. 16, p. 47-52, 2016.
27
28 HANSEN, P. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm
29 Animals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 752, p. 1-22, 2014.
30
31 HENDRIKSEN, P. J.; VOS, P. L.; STEENWEG, W. N.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.
32 Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes.
33 **Theriogenology**, v. 53, p. 11–20, 2000.

- 1
2 IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of Predicting Stages of
3 Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. **Journal Dairy Science**,
4 v. 63, p. 155-160, 1980.
5
6 LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; NORTHEY, D. L.;
7 FIRST, N. L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of**
8 **Reproduction**, v. 36, p. 376-383, 1987.
9
10 LONERGAN, P.; FAIR, T.; FORDE, N.; RIZOS, D. Embryo development in dairy cattle.
11 **Theriogenology**, v. 86, p. 270-277, 2016.
12
13 MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; PETELIKOVA, J.; DVORACEK, V. Developmental
14 competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous
15 cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801–810, 1996.
16
17 MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental
18 competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in*
19 *vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329–335, 2004.
20
21 MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles.
22 **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200–214, 2008.
23
24 MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUZA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H.
25 B. Factors associated to the donor influencing the production of embryos *in vitro* (PIVE).
26 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 51-57, 2016.
27
28 MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J. M.; MAZERBOURG,
29 S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP
30 system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 139-154, 2002.
31
32 MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONSALVES, P. B. D. Controle do estro e da
33 ovulação em bovinos e ovinos. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF **Biotécnicas**
34 **Aplicadas à Reprodução Animal**, Sao Paulo: Livraria Varela, 2001.

1 cap.3, p.25-55.

2

3 ONGARATTO, F. L.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; TRIBULO, A.; BO, G. A. Effect of
4 follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of
5 cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Animal**
6 **Reproduction**, v. 12, p. 876-883, 2015.

7

8 PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm
9 separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early
10 embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

11

12 PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E.; OLIVEIRA, F. A.; ZOLINI, A. M.;
13 OLIVEIRA, C. T.; SOARES, Í. A. C.; TORRES, C. A. A. Influence of dominant follicle and
14 corpus luteum on recovery of good quality oocytes for *in vitro* embryo production in cattle.
15 **British Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1305-1312, 2014.

16

17 PERRY, G. IETS 2017. 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm
18 animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 35, p. 1-46, 2017.

19

20 PIRESTANI, A.; HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; FOROUZANFAR, M.; MOULAVI, F.;
21 ABEDI, P. Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle.
22 **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 4, p. 172-175, 2011.

23

24 REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; SILVA, F. M. Efeito da estrutura ovárica e da
25 idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de
26 embriões produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**
27 **Science**, v. 43, p. 629-636, 2006.

28

29 SANTOS, M. V. O.; QUEIROZ NETA, L. B.; BORGES, A. A.; SILVA, M. B.; PEREIRA,
30 A. F. Influência do corpo lúteo sobre a recuperação de oócitos imaturos bovinos derivados de
31 fêmeas post-mortem. **Holos**, ano 33, v. 07, p. 278-283, 2017.

32

- 1 SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: 3º
2 Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 2008, Londrina. **Biotechnologia da**
3 **reprodução em bovinos** (3º simpósio internacional de reprodução animal aplicada), 2008. v.
4 3. p. 175-194.
5
- 6 SARTORI, R.; MONTEIRO Jr, P. L. J.; WILTBANK, M. C. Endocrine and metabolic
7 differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive
8 management. **Animal Reproduction**, v. 13, p. 168-181, 2016.
9
- 10 SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R.
11 Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery.
12 **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.
13
- 14 SILVA, J. R. V.; BRITO, I. R.; LEITÃO, C. C. F.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, M. J.;
15 VASCONCELOS, G. L.; SARAIVA, M. V. A.; ALMEIDA, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.
16 Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à
17 insulina1 (IGF-1) em folículos ovarianos caprinos. In: Resumos da XXII Reunião Anual da
18 SBTE (Guarujá, SP, Brasil). 2008. p.466.
19
- 20 SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time interval
21 between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle
22 oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 699-708, 1999.
23
- 24 VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em
25 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, ano XVI, edição 51, p. 6-10, 2012.
26
- 27 WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA, E.
28 O. S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.;
29 FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU
30 and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo
31 transfer. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 635-644, 2017.
32

1 WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian and follicle quality on
2 morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal**
3 **Animal Science**, v. 78, p. 1277-1283, 2000.

4
5 ZEUNER, A.; MULLER, K.; REGUSZYNSKI, K.; JEWGENOW, K. Apoptosis within
6 bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation.
7 **Theriogenology**, v. 59, p. 1421-1433, 2003.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

- 1 **Tabela 1** - Dados da produção *in vitro* de embriões bovinos obtidos a partir da aspiração
 2 folicular ovariana contendo diferentes estruturas lúteas (corpo lúteo inicial/corpo lúteo),
 3 associados ou não à presença do folículo dominante.

Grupos	Nº de COC's recuperados (N)	Taxa de clivagem % (n)	Taxa de blastocisto % (n)
Controle	138	36,23 (50) ^{bc}	26,81 (37) ^b
G1 (CL inicial sem FD)	341	35,19 (120) ^c	29,62 (101) ^b
G2 (CL sem FD)	202	44,06 (89) ^{ab}	37,62 (76) ^a
G3 (CL inicial com FD)	552	45,65 (252) ^a	9,24 (51) ^c
G4 (CL com FD)	456	50,22 (229) ^a	10,09 (46) ^c
Total/Valor de p	2101	< 0,0001	< 0,0001

- 4 Taxas seguidas de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) dentro de uma mesma coluna,
 5 representa diferença entre os grupos estudados; CL = corpo lúteo; FD = folículo dominante.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

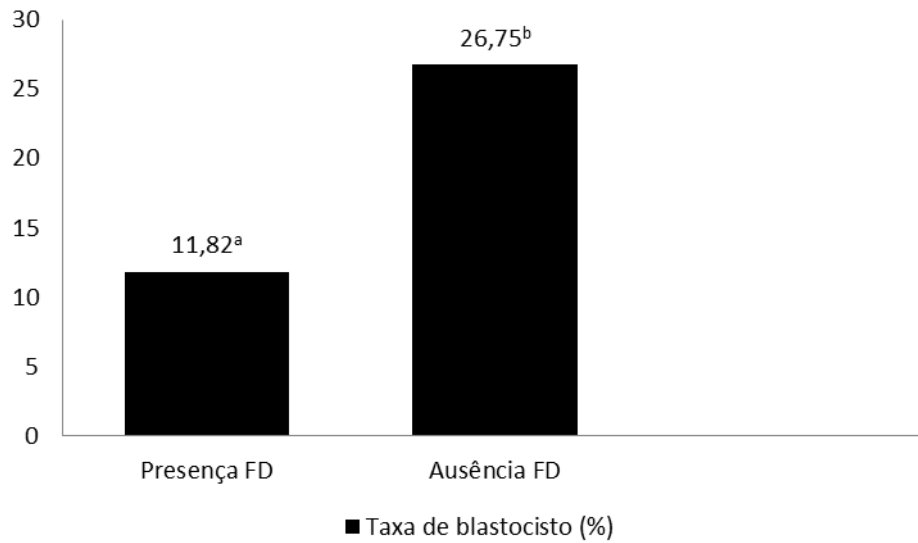
22

23

24

25

1 **Figura 6** - Taxa de blastocisto a partir de ovários com presença ou ausência de folículo
2 dominante no momento da aspiração folicular ovariana em bovinos ($P < 0,05$).



3

4 Letras minúsculas sobrescritas (^{a,b}) representam diferença entre os grupos.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

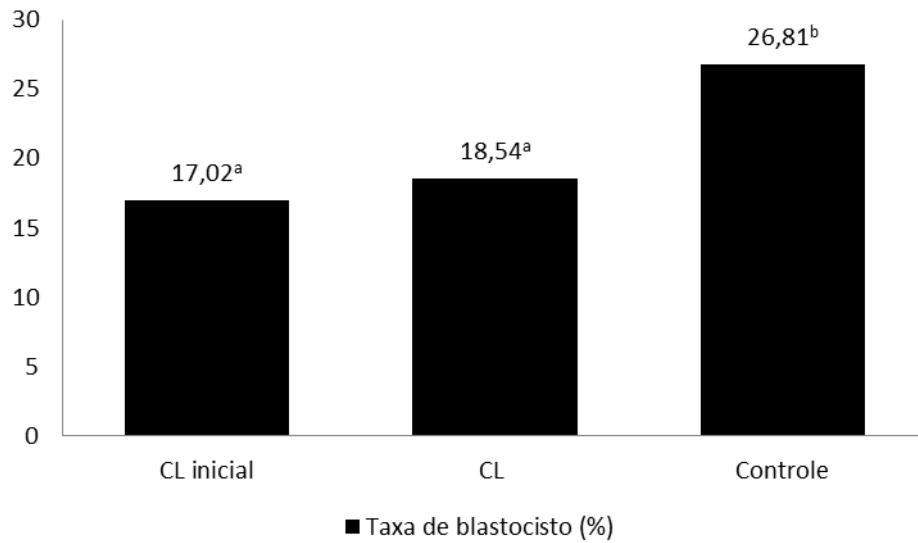
21

22

23

24

1 **Figura 7** – Taxa de blastocisto a partir de ovários contendo corpo lúteo em diferentes estágios
2 de desenvolvimento no momento da aspiração folicular ovariana em bovinos ($P = 0,067$).



3

4 Letras minúsculas sobrescritas (^{a,b}) representam diferença entre os grupos.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

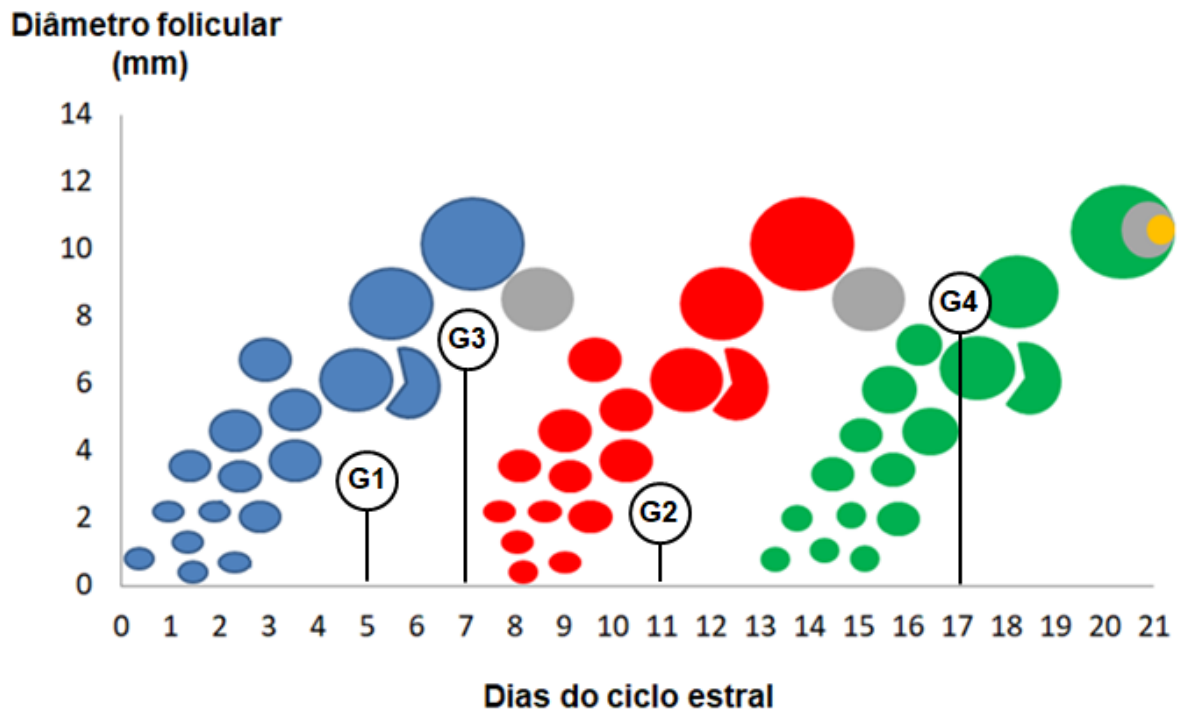
21

22

23

24

- 1 **Figura 8** – Indicação do momento da onda de crescimento folicular em que se encontram os
 2 grupos experimentais: G1 (Corpo lúteo inicial e ausência de folículo dominante), G2 (Corpo
 3 lúteo e ausência de folículo dominante), G3 (Corpo lúteo inicial e presença de folículo
 4 dominante), G4 (Corpo lúteo e presença de folículo dominante).



- 5
 6 **Fonte:** Adaptado de Baruselli et al., 2003.

7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a seleção pós abate de pares ovarianos com a presença de corpo lúteo funcional associada à ausência de folículo dominante proporciona a maior eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos. Possivelmente tais características são referentes ao início da segunda onda de crescimento folicular do ciclo estral, o momento mais indicado para a aspiração folicular e obtenção de oócitos com maior competência para serem fecundados e desenvolver-se em embriões.

Deste modo, a ausência do folículo dominante no momento da aspiração resultou em maiores taxas de blastocisto. No entanto, a presença do CL em diferentes estágios de desenvolvimento não exerceu nenhum efeito sobre a taxa de produção embrionária. Assim, novos estudos visando à compreensão dos efeitos individuais que o corpo lúteo e o folículo dominante exercem sobre a qualidade oocitária ainda são necessários para o aprimoramento e validação do método de classificação apresentado.