

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DE NORGESTOMET NA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA
FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS DA
RAÇA GIR E HOLANDESA**

Campos dos Goytacazes

2013

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DE NORGESTOMET NA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA
FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS DA
RAÇA GIR E HOLANDESA**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Biotecnologia da Reprodução”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes

Coorientador: Dr. Bruno Campos de Carvalho

Campos dos Goytacazes

2013

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DE NORGESTOMET NA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR E
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS DA RAÇA GIR E HOLANDESA**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Biotecnologia da Reprodução”.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Dr. Bruno Campos de Carvalho (Doutor, Ciência Animal) – EMBRAPA Gado de Leite

Dra. Raquel Varella Serapião (Doutora, Ciência Animal) – PESAGRO-RIO

Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Dr. José Fedrericco Stranggiotti Silva (Doutor, Medicina Veterinária) – UENF

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Ciências Veterinárias) – UENF
(Orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 044/2013

Narváez Bedoya, Héctor Javier

Efeito de norgestomet na sincronização da onda folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir e Holandesa / Héctor Javier Narváez Bedoya. – 2013.
95 f. : il.

Orientador: Reginaldo da Silva Fontes.

Tese (Doutorado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 78 – 95.

1. Progestágenos 2. Dinâmica folicular 3. OPU 4. *Bos indicus* 5. *Bos taurus* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.208245

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
HÉCTOR NARVÁEZ GONZÁLEZ E MARIA
DORIS BEDOYA DE NARVÁEZ, por todo o
amor e apoio na realização dos meus sonhos;
À minha querida namorada, GINA
MARCELA MICÁN CASTIBLANCO, por estar
sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Durante estes últimos 4 anos de caminhada no Brasil, conheci e fiz inúmeros amigos e pude contar com o apoio de várias pessoas para o desenvolvimento das minhas atividades acadêmicas, tenho certeza que todas essas pessoas me ajudaram de uma ou outra forma para que tudo ocorresse da melhor maneira possível.

Agradeço de coração...

A Deus, por ter me permitido nascer em uma família tão maravilhosa, ter me acompanhado durante estes últimos anos fora do meu país e distante das pessoas que tanto amo;

*Aos meus queridos pais, Maria Doris Bedoya de Narváez e Héctor Narváez González, que são minha fonte de inspiração, me deram sempre todo o apoio e fortaleza quando sempre precisei. É por eles que tudo o que eu faço na minha vida é sempre pensado em retribuí-les com orgulho e felicidades.....**LOS AMO MUCHISIMO Y PARA USTEDES TODA MI GRATITUD Y ADMIRACIÓN;***

À minha irmã, Isabel Cristina Narváez Bedoya, que apesar do pouco tempo que estive na terra, nos ensinou a lutar pelo mais valioso que temos: A VIDA. Onde você estiver olhando por nós, saiba que durante todos estes anos após tua partida, não tem um dia que não me lembre de você;

A Gina Marcela Micán Castiblanco, minha namorada, minha grande amiga e companheira de vida, muito obrigado por ter se dedicado na realização desta obra. Por todos os momentos de alegria, aprendizado e futuros caminhos que espero sempre percorrer do seu lado;

A toda minha família materna e paterna, que sempre me impulsionaram, aconselharam e se preocuparam em saber como eu estava.

A senhora Martha Inés Catiblanco Contreras, ao senhor Armando Micán Rojas e Wilman Micán Castiblanco por terem sempre me tratado como da família, pela força e preocupação para que tudo sempre saísse da melhor maneira nas nossas vidas;

Ao professor Reginaldo da Silva Fontes, pela orientação, ensinamentos, por ter me acolhido desde a época do estágio de especialização;

Aos professores do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal: Reginaldo da Silva Fontes, Ângelo José Burla Dias, Célia Raquel Quirino, Frederico Straggiotti Silva, Francisco Aloizio da Fonseca e Maria Clara Caldas Bussiere, Rosemary Bastos, entre muitos outros, pela grandiosa contribuição na minha formação acadêmica;

À secretária de Pós-graduação, Jovana Campos pela amizade, pela enorme competência e disposição com que sempre me recebeu e me ajudou a resolver todas as minhas inquietudes;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela concessão da bolsa de Doutorado;

A todos os professores e funcionários da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro com que convivi e me ofereceram sua amizade e carinho;

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Reprodução Animal, em especial ao meu amigo e pessoa abençoada por Deus Roberto Vidal, grande Vidal, pela amizade, humildade e alegria que sempre o caracterizou;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal: Diego, Mauricio, Bruno, Felipe, Valter, Gester, Fernanda, Carol, Kelen, Aline, Janaina, Tiago, Leoni, Wilder e Roger, pelo convívio e bons momentos de diversão;

Aos meus amigos de república e colegas: Bruno, Felipe, Julio, Matheus e Roger, pela excelente convivência, pelos inúmeros churrascos e pelas nossas conversas científicas e não científicas;

Ao meu grande amigo Jorge Romero Ferrer, pelos conselhos, pela valiosa amizade que me proporcionou, pelas nossas viagens e por todos os momentos de descontração;

Ao meu excelente amigo e colega Diego Fernando Dubeibe Marín, pela humildade, competência, bom caráter e pelos grandes momentos nas festas e churrascos que todo fim de semana tinha motivo para comemorar;

Aos meus amigos Mauricio Mogollon e Amanda Jiménez, pela preocupação e incentivo nesta caminhada;

Aos amigos Diana Catalina Cubides e Geraldo David, pela amizade, pela disposição e colaboração em todos os momentos que eu precisei;

Aos amigos Wilder Ortiz e Maritza Mantilla, pela amizade;

Às minhas grandes amigas, Cintia Leite e Ana Paula Toledo, obrigado pelo carinho, vocês sempre muito especiais e dispostas a me ajudar. Apesar da distância, saibam que podem contar sempre comigo;

Aos meus queridos amigos Valter e Jessica, pela amizade e carinho;

Aos amigos Sebastian e Fernanda pelos gratos momentos;

Ao meu orientador Bruno Campos de Carvalho, que me abriu as portas dessa renomada e respeitada instituição EMBRAPA Gado de Leite, obrigado pelos ensinamentos, pelas viagens de Juiz de Fora para o Campo

Experimental Fazenda Santa Mônica – CEFSM e sem seu suporte não seria possível concluir este trabalho;

A Lilian Tamy Iguma, por possibilitar a elaboração e execução deste trabalho no Campo Experimental Fazenda Santa Mônica, muito obrigado pela gentileza com que você sempre me tratou;

Às adoráveis amigas Raquel Varella Serapião e Clara Slade Oliveira, obrigado pela dedicação total, pela alegria e as boas risadas durante os dias longos de trabalho, vocês foram peça fundamental na execução deste projeto com grande competência e profissionalismo;

Aos estagiários, Frederico Graça e Pedro Caldas, pelo auxílio no trabalho prático, apesar de intenso, vocês permitiram que fosse mais descontraído e agradável;

Ao meu amigo e colega Agostinho Camargo, sua dedicação e ensinamentos contribuíram demais para a execução do trabalho, muito obrigado pelos bons momentos de confraternização na sua casa, você e sua família me acolheram sempre da melhor maneira e me fizeram sentir como parte dela;

Ao Dr. Célio de Freitas, obrigado por atender os meus pedidos me auxiliando com alguns materiais.

Aos amigos do Campo Experimental Santa Mônica, Dr. Paulino, Dr. Célio, Priscila, Landeiro, Adilson, Marcelo (Chin, o homem Show da fazenda), Betinho, Sidney, Geraldino, Jabutirica, Cesar Prata, Francisco (o perigoso), Ruizinho, Valdir, Wallace, Joaquim, Cuca, Sebastião, Paulinho, Dadá, Mourão, Dona Nelly, a todos muito obrigado pela amizade e colaboração. Agradecimentos especiais para Adilson que me permitiu morar em sua casa e foi minha mão direita no trabalho prático e deslocamento dos animais para o curral;

Aos amigos e amigas da minha linda cidade, La Dorada – Caldas – Colômbia, que sempre se preocuparam como estava minha vida no Brasil, a todos muito obrigado, em especial ao meu amigo de infância e irmão Jose Edgar Uribe, pela amizade verdadeira e carinho;

A todas as vacas Gir e Holandesas que fizeram parte deste trabalho, sem a participação de vocês o trabalho nunca teria iniciado.

A todos, meu muito obrigado!!!

RESUMO

BEDOYA. H.J.N. **Efeito de norgestomet na sincronização da onda folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir e Holandesa.** 2013. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da aplicação de um implante auricular de norgestomet reutilizado ou dois implantes novos na sincronização da onda folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*). Um total de 12 vacas pluríparas, não lactantes, foram selecionadas, seis da raça Gir e seis da raça Holandesa, submetidas a 6 sessões consecutivas de aspiração folicular com intervalo de 14 dias. Foi realizado um delineamento “crossover” e a cada sessão de aspiração folicular as vacas foram alternadamente submetidas a cada um dos tratamentos hormonais: tratamento controle – animais que não receberam implante auricular de norgestomet, tratamento norgestomet baixo – animais que receberam um implante auricular de norgestomet reutilizado e tratamento norgestomet alto – fêmeas que receberam dois implantes auriculares novos (6 mg de norgestomet combinado). Os três tratamentos hormonais foram conformados por 4 fêmeas (2 vacas Gir – 2 vacas Holandesas). Para sincronizar a emergência da nova onda folicular, administrou-se em todas as vacas 3 mg de benzoato de estradiol mais 150 µg de D-cloprostenol, para eliminar a presença de corpo lúteo e a influência de progesterona endógena nos tratamentos. A aspiração folicular foi realizada sete dias após o início dos tratamentos hormonais, utilizando ultrassom Mindray com transdutor microconvexo com frequência 7,5 MHz. Os implantes auriculares foram removidos 24 horas após a OPU. Foram puncionados folículos ≥ 3 mm de diâmetro, os oócitos recuperados foram avaliados morfológicamente, selecionados, maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. Os dados foram analisados com auxílio do Software Analysis and Experimentation Group (SAEG, versão 9.1). Foram considerados no modelo estatístico os tratamentos, os grupos genéticos e as sessões de aspiração folicular, sendo verificadas as influências destes fatores e a interação mediante ANOVA, e nos casos em que foi obtido efeito significativo ($P < 0,05$), foram comparadas as médias pelo

teste de Tukey. Houve efeito significativo nas vacas da raça Gir no número de oócitos grau I do tratamento norgestomet baixo em relação ao controle e norgestomet alto ($4,0 \pm 0,6$ vs $1,1 \pm 0,5$ e $2,4 \pm 0,8$, respectivamente) e no número de blastocistos no dia sete do tratamento norgestomet baixo ($5,1 \pm 0,5$) quando comparado com os tratamentos controle ($3,0 \pm 0,7$) e norgestomet alto ($2,7 \pm 0,6$). Conclui-se que a inserção de um implante auricular de norgestomet de segundo uso em vacas da raça Gir, melhora o número de oócitos grau I e de embriões no dia sete.

Palavras-chave: progestágenos, dinâmica folicular, OPU, *Bos indicus*, *Bos taurus*.

ABSTRACT

BEDOYA. H.J.N. **Effect of norgestomet in synchronization follicular wave and *in vitro* embryo production in Gir and Holstein breeds.** [Efeito de norgestomet na sincronização da onda folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir e Holandesa]. 2013. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

The aim of this study was to determine the effect used in auricular norgestomet implant or two new norgestomet implants in synchronized follicular wave and *in vitro* embryo production of Gir (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) breeds. A total of 12 pluriparous, non-lactating cows were selected in this study, 6 Gir and 6 Holstein. The animals were subjected to six consecutive ovum pick-up (OPU) with fourteen days of interval. The study was performed in crossover design and at each OPU session the cows were subjected alternately to one of the hormonal treatment, control – animals that did not receive auricular implant, low norgestomet – animals receiving used auricular implant of norgestomet, high norgestomet – cow treated with two new norgestomet implant (6 mg of norgestomet combined). Hormonal treatments were conformed for four animals (two cows Gir – two cows Holstein). For synchronize the emergence of a new follicular wave, all cows received 3 mg of estradiol benzoate and 150 µg D-cloprostenol to eliminate the presence of corpus luteum and endogenous progesterone influence in the treatment. The OPU was performed 7 days after the beginning of hormonal treatment using 7.5 MHz probe microconvex transvaginal. The ear devices were removed 24 hours after OPU. All follicles ≥ 3 mm were aspirated and the oocytes recovered were morphologically evaluated, selected, matured, fertilized and cultured for *in vitro* embryo production. Data were analyzed using Software Analysis and Experimentation Group (SAEG, version 9.1). The effects the treatments, genetic group and OPU sessions and interaction were evaluated by ANOVA. The means were compared by Tukey test ($P < 0.05$). There was a difference for the Gir cows number oocyte grade 1 of the low norgestomet treatment that control and high norgestomet (4.0 ± 0.6 vs 1.1 ± 0.5 and 2.4 ± 0.8 , respectively) and number of embryos on day seven of the low norgestomet treatment (5.1 ± 0.5) that control (3.0 ± 0.7) and high norgestomet (2.7 ± 0.6). In conclusion, the present study

demonstrated that using an auricular implant of norgestomet previously used in Gir cows, increase the number oocyte grade 1 and number embryo on day seven.

Keywords: progestagens, follicular dynamics, OPU, *Bos indicus* and *Bos taurus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química de norgestomet e de progesterona	33
Figura 2.	Vacas Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesas (<i>Bos taurus</i>), doadoras de oócitos, Campo Experimental Fazenda Santa Mônica – CEFSM, EMBRAPA Gado de Leite, Valença – RJ, 2012	44
Figura 3.	Representação esquemática dos tratamentos hormonais associados a implantes auriculares de norgestomet (Crestar®), em vacas Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>), Valença – RJ, 2012	47
Figura 4.	Representação esquemática do delineamento “crossover” alternado, com a utilização de implantes auriculares de norgestomet em vacas Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>), submetidas à aspiração folicular a cada 14 dias, Valença – RJ, 2012	49
Figura 5.	População folicular de vacas Gir (6) Holandesas (6), no início e no final dos tratamentos hormonais	57
Figura 6.	Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para número de folículos visualizados, Valença – RJ, 2012	71
Figura 7.	Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para número de oócitos grau I, Valença – RJ, 2012	73
Figura 8.	Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para taxa de clivagem (%), Valença – RJ, 2012	73
Figura 9.	Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para taxa de blastocisto (%), Valença – RJ, 2012	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição da classificação dos CCOs	51
Tabela 2.	Efeito das variáveis tratamento, grupo genético e sessão de aspiração folicular e suas interações, Valença – RJ, 2012	56
Tabela 3.	Efeito da sincronização da onda folicular e número médio de folículos ovarianos de vacas Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesas (<i>Bos taurus</i>) tratadas com benzoato de estradiol e prostaglandina ou benzoato de estradiol e prostaglandina associado a implantes auriculares de norgestomet, Valença – RJ, 2012	59
Tabela 4.	Efeito do tratamento hormonal associado a implantes auriculares de norgestomet, sobre a qualidade oócitos de vacas da raça Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>), Valença – RJ, 2012	65
Tabela 5.	Efeito do tratamento hormonal associado a implantes auriculares de norgestomet, sobre a recuperação de oócitos e produção <i>in vitro</i> de embriões de vacas Gir (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>), Valença – RJ, 2012	68
Tabela 6.	Efeito do grupo genético sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões, Valença – RJ, 2012	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP: Proteína morfogenética óssea

bST: somatotropina bovina

CCOs: complexos *cumulus*-oócitos

CGP: células germinativas primordiais

CL: corpo lúteo

COX-2: ciclooxigenase 2

eCG: gonadotrofina coriônica equina

FGF-8: fator de crescimento fibroblástico – 8

GDF-9: fator de crescimento diferencial – 9

GH: hormônio de crescimento

GHRH: hormônio liberador de hormônio do crescimento

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

IGF: fator de crescimento similar a insulina

LHR: receptores de LH

OPU-PIV: aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões

PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}

PGR: receptores de progesterona

SFB: soro fetal bovino

VG: vesícula germinativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Oogênese e foliculogênese em bovinos	22
3.2	Ciclo estral dos bovinos	24
3.3	Dinâmica folicular ovariana	25
3.4	Importância de progesterona na regulação do ciclo estral	29
3.5	Associação de progesterona ou progestágenos em protocolos de sincronização de estro e da ovulação	32
3.6	Importância de progesterona na produção de embriões <i>in vitro</i> ...	35
3.7	Influência do grupo genético nos programas OPU-PIV	36
3.8	Influência de progesterona ou progestágenos na competência oocitária e produção <i>in vitro</i> de embriões	40
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1	Animais e instalações	44
5.2	Ultrassonografia das estruturas ovarianas	45
5.3	Tratamento hormonal para a sincronização da onda folicular	45
5.4	Delineamento experimental	48
5.5	Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	50
5.6	Produção <i>in vitro</i> de embriões	52
5.6.1	Maturação <i>in vitro</i>	52
5.6.2	Preparo dos espermatozoides	52
5.6.3	Fertilização <i>in vitro</i>	53
5.6.4	Cultivo <i>in vitro</i>	53

5.6.5	Avaliação da taxa de clivagem	53
5.6.6	Avaliação da taxa de blastocisto	54
5.7	Análise estatística	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1	Efeito do tratamento hormonal em relação à população folicular e eficiência da sincronização da onda.....	57
6.2	Efeito do tratamento hormonal e do grupo genético sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões	63
6.3	Interação entre grupo genético e sessão de aspiração folicular ..	71
7	CONCLUSÕES	76
8	IMPLICAÇÕES	77
9	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do setor agropecuário tem sustentado grande parte o crescimento econômico do Brasil nos últimos anos. O enorme patrimônio representado pelo rebanho bovino nacional com estimativa de 212,8 milhões de cabeças (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2012), justifica plenamente o contínuo investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem maior produtividade do setor agroindustrial.

No entanto, o mundo vem enfrentando uma série de preocupações referentes a mudanças climáticas, segurança alimentar e crescimento populacional, onde se estima que para o ano de 2050 o número de habitantes esteja em 9,1 bilhões (MURPHY, 2012). Portanto, a produção de alimentos precisa ser dobrada e uma das medidas que podem ser adotadas é a seleção de raças mais produtivas, sistemas que permitam maior produção em menor área, menor uso de água e melhora na qualidade dos alimentos que são proporcionados aos animais, utilizando modelos ambientalmente sustentáveis (MURPHY, 2012).

A utilização das técnicas de reprodução assistida é considerada a base da produção pecuária mundial, tornando-se cada vez mais importante para enfrentar parte dos desafios presentes nas próximas décadas. Devido a isso, a utilização da técnica de aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), possibilita aumentar o número de nascimentos por fêmea de alto valor genético, melhorando o ganho genético anual de 2% proporcionado pela inseminação artificial para 2,5% aproximadamente quando aplicado em programas de OPU-PIV (VISHWANATH, 2003).

Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) em 2010, o Brasil foi responsável por 58,7% da produção mundial de embriões *in vitro*, consolidando-se como líder absoluto na aplicação da técnica (STROUD e CALLESEN, 2012). Esse ótimo desempenho apresentado no país é atribuído principalmente às raças zebuínas, com uma participação de 84,6% e 15,4% de contribuição das raças taurinas e mestiças (VIANA, 2012).

Apesar do progresso obtido nos últimos anos nos programas OPU-PIV, as taxas de produção de blastocistos são consideradas baixas, em torno de 30 a 40%

(HASLER et al., 1995; 1998) e com um número reduzido de embriões transferíveis (MERTON et al., 2003).

Existem múltiplos fatores que afetam o sucesso dos programas OPU-PIV. Entre eles é possível citar a realização da técnica em fase aleatória do ciclo estral, a obtenção de oócitos em diferentes etapas de desenvolvimento ou em fase de atresia (HENDRIKSEN et al., 2000; VASSENA et al., 2003), além da variabilidade de resposta dos animais e dos sistemas de cultivo *in vitro* empregados (LONERGAN e FAIR, 2008). A influência destes fatores pode diminuir a competência dos oócitos para o desenvolvimento *in vitro*, afetando a produção e qualidade dos embriões, causando perdas de material genético e perdas econômicas nos programas OPU-PIV (BLONDIN e SIRARD, 1995).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a eficiência da técnica de aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões, através da sincronização da onda de crescimento folicular junto à aplicação de gonadotrofinas, visando melhorar a taxa de recuperação, a qualidade dos oócitos colhidos e o número de embriões produzidos (BLONDIN et al., 1997a;b; SIRARD et al., 1999; GOODHAND et al., 2000; CHAUBAL et al., 2007; PFEIFER et al., 2009a; EL-SHERRY et al., 2010).

Poucos relatos da literatura indicam que a administração exógena de progesterona ou progestágenos, como os implantes auriculares de norgestomet aplicados antes da OPU, podem estar relacionados com a melhora da qualidade dos oócitos, influenciando provavelmente a produção de embriões *in vitro* (BORCHERT et al., 1999; PFEIFER et al., 2009a). Sabe-se que baixas concentrações de progesterona (1 a 2 ng/mL) ou a utilização de implantes auriculares de norgestomet, aumentam a frequência dos pulsos de LH, estimulando a atividade da aromatase nas células da granulosa e conseqüentemente incrementa-se a produção de estradiol intrafolicular. Estudos observaram que o estradiol estimula o hipotálamo secretando o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), liberando em resposta o hormônio do crescimento (GH) (EL-SHERRY et al., 2010). Por sua vez, o GH e o estradiol têm capacidade de estimular a secreção hepática de IGF-1, sendo este fator relacionado com proliferação das células da granulosa (SPICER et al., 1993), esteroidogênese, crescimento folicular (EL-SHERRY et al., 2010), qualidade oocitária (GRIMARD et al., 2012) e reserva ovariana (EVANS et al., 2012).

Além disso, uma vantagem da utilização de implantes auriculares de norgestomet em protocolos para aspiração folicular quando comparado aos implantes intravaginais de progesterona, estaria relacionado a que os implantes intravaginais podem causar em alguns animais secreção vaginal mucoide. Sendo esta secreção geralmente com consistência viscosa e asséptica, decorrente de um processo irritativo que pode dificultar o procedimento de aspiração folicular, por causar acúmulo de muco na agulha e no circuito diminuindo a recuperação dos oócitos (SENEDA et al., 2006).

Desta forma, em razão à importância de progesterona na reprodução, o presente estudo foi realizado a fim de estudar o efeito dos implantes auriculares de norgestomet (Crestar[®]) em bovinos das raças Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) no desempenho da produção *in vitro* de embriões.

2. HIPÓTESE

A utilização de implantes auriculares de norgestomet durante protocolos de sincronização da onda folicular antes da OPU melhora a qualidade oocitária e a produção de embriões *in vitro* em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE EM BOVINOS

Nos mamíferos, a oogênese tem início durante o desenvolvimento embrionário, sendo as cristas germinativas, também denominadas como cristas gonadais, as estruturas precursoras das gônadas (AERTS e BOLS, 2010). Em embriões bovinos, as cristas genitais se desenvolvem aproximadamente no 35º dia de gestação (ERICKSON, 1966a). As gônadas são invadidas por células germinativas primordiais (CGP), oriundas da endoderme do saco vitelínico, formando os cordões sexuais (ADAMS et al., 2008). Durante o processo de migração das CGP e invasão das cristas germinativas (em bovinos ocorre entre os dias 30 e 64 de gestação), estas células se multiplicam por mecanismo de divisão celular mitótica (ADAMS et al., 2008). O número máximo de CGP é alcançado no momento da transição das divisões mitóticas para o início da meiose com um número estimado de 2.100.000 a 2.700.000 (ERICKSON, 1966a; SMITZ e CORTVRINDT, 2002), sendo que antes do nascimento esse número de CGP é reduzido drasticamente por mecanismos apoptóticos para 130.000 (ERICKSON, 1996b; AERTS e BOLS, 2010).

Após o processo de invasão das cristas germinativas pelas CGP o mecanismo de mitose cessa (ADAMS et al., 2008) e os cordões sexuais se desagregam formando um grupo de células que desenvolvem o rete ovarii e o estroma vascular ovariano (LIN et al., 2002). Desta maneira, as células germinativas passam a ser denominadas de oogônias, sendo estas circundadas por células somáticas achatadas, formando os folículos primordiais (van den HURK e ZHAO, 2005).

Em determinado período da vida fetal (75 a 80 dias de gestação) (ADAMS et al., 2008) as oogônias passam a se dividir por meio da meiose até a prófase I, tornando-se oócitos primários, permanecendo bloqueados por meses ou anos até a puberdade. Esta fase é conhecida também como estágio de vesícula germinativa (VG) (LEAL e ADONA, 2006; ADAMS et al., 2008). A retomada da meiose somente é iniciada em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (AERTS e BOLS, 2010), progredindo até o estágio de metáfase II (MII), quando é bloqueada novamente. A

meiose só será completada após a fecundação do oócito, iniciando-se os ciclos mitóticos do desenvolvimento embrionário (LEAL e ADONA, 2006).

A foliculogênese refere-se ao crescimento dos folículos ovarianos envolvendo uma série de eventos ou mudanças sequenciais no crescimento e desenvolvimento dos folículos até a ovulação de um oócito maduro. A foliculogênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais, verificando-se um crescimento regular no diâmetro dos oócitos, assim como mudanças na conformação das células da granulosa (AERTS e BOLS, 2010). BINELLI e MURPHY (2010) observaram que o crescimento dos folículos primordiais sofre um processo de ativação folicular que incrementa gradualmente o diâmetro do oócito, apresentando proliferação das células foliculares e mudanças na conformação das células da granulosa que passam de um formato achatado para, esta mudança no tipo de células permite o passo de folículos primordiais a primários. À medida que o número de camadas de células da granulosa aumenta e a formação das células da teca e zona pelúcida inicia-se, os folículos passam a ser denominados secundários (HIRSHFIELD, 1991). A fase seguinte do folículo terciário ou antral é considerada o estágio mais evoluído do desenvolvimento folicular, quando se forma uma cavidade preenchida por fluído folicular, o antro. O crescimento destes folículos é absolutamente dependente das gonadotrofinas (ADAMS et al., 2008; AERTS e BOLS, 2010). A última fase da foliculogênese ocorre com a formação do folículo pré-ovulatório (HIRSHFIELD, 1991).

Na fase de ativação dos folículos primordiais, destaca-se a participação de fatores de crescimento, tais como a proteína morfogenética óssea – 4, 7 e 15 (BMP-4, BMP-7 e BMP-15) e o fator de crescimento diferencial - 9 (GDF-9) (FORTUNE, 2003; BINELLI e MURPHY, 2010; FAIR, 2010). Esses fatores produzidos pelos oócitos regulam e estimulam a proliferação das células da granulosa (BURATINI, 2007). No entanto, o crescimento dos folículos secundários é regido pelo fator de crescimento similar à insulina – 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) (FORTUNE, 2003; SILVA et al., 2009). Já na formação dos folículos antrais tem-se a participação do fator de crescimento fibroblástico – 8 (FGF-8), IGF-1, IGF-2, além da participação das gonadotrofinas, como o FSH que induz a formação do antro e o LH mais relacionado à fase pré-ovulatória (FORTUNE, 2003; BINELLI e MURPHY, 2010; FAIR, 2010).

3.2 CICLO ESTRAL DOS BOVINOS

Em fêmeas bovinas, o intervalo entre dois estros de maneira consecutiva é denominado ciclo estral. O ciclo estral bovino é um ritmo funcional dos órgãos reprodutivos das fêmeas que se estabelece a partir da puberdade. Compreende modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos reprodutivos e principalmente mudanças nas concentrações dos hormônios da reprodução. As fêmeas bovinas são consideradas poliéstricas não estacionais, que apresentam ciclos estrais com uma duração média de 21 dias, com variação de 17 a 24 dias, tanto em raças zebuínas (PINHEIRO et al., 1998; GAMBINI et al., 1999) quanto em raças europeias (BÓ et al., 2000).

O ciclo estral é regido por interações e antagonismos endocrinológicos de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, gônadas e útero (MACMILLAN e BURKE, 1996). Durante o ciclo estral existe um longo período denominado fase luteal, caracterizado pelo desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo (CL), com secreção de progesterona (RATHBONE et al., 2001) e um período mais curto denominado fase folicular, caracterizado pelas baixas concentrações plasmáticas de progesterona e aumento na concentração de estradiol, hormônio secretado pelo folículo dominante (MACMILLAN e BURKE, 1996). O aumento da concentração de estradiol é responsável pelo comportamento de estro, evento de receptividade sexual que tem uma duração entre 30 minutos e 27 horas em vacas taurinas (LOPEZ et al., 2004) e entre 1,3 a 20 horas em vacas zebuínas (BÓ et al., 2002).

A regulação do ciclo estral é feita por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos por meio do eixo porta-hipotalâmico-hipofisário, com a síntese e liberação de hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) secretado pelo hipotálamo, o qual atinge a adenohipófise e estimula a produção de FSH e LH. A emergência da onda folicular é acompanhada por um pico transitório de FSH, sendo responsável pelo crescimento dos folículos recrutados em cada onda até a divergência folicular. O FSH também é responsável pelo crescimento do folículo dominante e expansão das células do *cumulus* dos oócitos (GINTHER et al., 2003). O FSH estimula a produção de estradiol, inhibina, activina e IGF-1 (GINTHER et al., 2003). O aumento na circulação de LH está relacionado com o mecanismo da divergência folicular, por meio da expressão dos seus próprios receptores (LHR) nas células da granulosa do

futuro folículo dominante. Além de outras funções tais como o estímulo na produção de esteroides e fatores de crescimento intrafoliculares que estão envolvidos na divergência folicular e posteriormente, no mecanismo da ovulação (GINTHER et al., 2003).

Após a ovulação, as células da teca e da granulosa passam por alterações morfológicas e são responsáveis pela formação do corpo lúteo, estrutura responsável pela secreção de progesterona durante a maior parte do ciclo estral (SANGHA et al., 2002). A liberação de progesterona restringe a secreção de LH com pulsos de baixa frequência durante a fase luteal do ciclo estral, exercendo um mecanismo de retroalimentação negativa sobre o hormônio GnRH (RATHBONE et al., 2001). Caso o oócito ovulado não seja fertilizado ou ocorra alguma falha no desenvolvimento embrionário inicial, haverá liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) pelas células endometriais entre o 15° e 17° dia do ciclo estral, dando início ao mecanismo luteolítico (FORDE et al., 2010). Após a luteólise ocorre diminuição nas concentrações plasmáticas de progesterona, que ocasiona o fim do mecanismo de retroalimentação negativa sobre a secreção de GnRH. Em consequência ocorre aumentando dos pulsos de LH, hormônio responsável pelo crescimento do folículo ovulatório, maturação do oócito e indução da ovulação, apresentando-se posteriormente, um novo ciclo estral (RATHBONE et al., 2001).

3.3 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA

Por meio de ultrassonografia foi possível comprovar que o crescimento dos folículos durante o ciclo estral ocorre em ondas foliculares (FORTUNE et al., 1988; SAVIO et al., 1988; PIERSON e GINTHER, 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988). Em bovinos, há variação de uma (SAVIO et al., 1988) a quatro ondas (SIROIS e FORTUNE, 1988), embora, seja mais frequente a ocorrência de duas a três ondas foliculares (SIROIS e FORTUNE, 1988; SAVIO et al., 1988). Cada onda envolve o desenvolvimento síncrono de um grupo de folículos (KASTELIC, 1994), que são geralmente entre 10 a 50 estruturas responsivas às gonadotrofinas, com um diâmetro de 2 a 3 mm. Uma parte desses folículos continua o crescimento e pelo menos um torna-se o folículo dominante (BONDENSTEINER, 1996).

A dinâmica folicular ovariana em fêmeas zebuínas da raça Nelore é caracterizada pela formação de três ondas de crescimento folicular em novilhas e duas ondas em vacas (BARROS et al., 1995; GAMBINI et al., 1999). Este padrão de crescimento folicular também foi observado por SAVIO et al. (1988) em fêmeas de raças taurinas.

As fases do desenvolvimento folicular foram definidas primeiramente por HODGEN, (1982) em primatas, sendo divididas em: recrutamento, seleção e dominância. Posteriormente, as mesmas definições foram adaptadas no ciclo estral dos bovinos (SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989).

Em fêmeas bovinas a emergência da primeira onda de crescimento folicular ocorre no dia da ovulação (AERTS e BOLS, 2010), sendo que cada onda folicular vem acompanhada por um pico transitório de FSH, até o maior folículo atingir um tamanho de 4 – 5 mm (BONDENSTEINER, 1996). Em animais com duas ondas de crescimento folicular a onda seguinte ocorre do 9° a 10° dia do ciclo estral. Já em fêmeas com três ondas foliculares, a emergência da segunda onda ocorre do 8° ao 9° dia do ciclo estral, enquanto a terceira onda ocorre entre o 15° e 16° dia (GINTHER et al., 1989; AERTS e BOLS, 2010).

Segundo BÓ et al. (1994), parte dos folículos recrutados cresce entre 4 a 6 mm, sendo que 2 a 5 dos maiores folículos continuarão o crescimento enquanto os demais, denominados como folículos subordinados regridem. Dos folículos que continuam o crescimento um torna-se o futuro folículo dominante, fase denominada como divergência folicular. Por volta do terceiro a quarto dia após a emergência da onda folicular a concentração plasmática de FSH reduz para níveis basais e o futuro folículo dominante é selecionado (GINTHER et al., 2000).

Em bovinos da raça Holandesa, a divergência tem início ao redor do dia 2,8 após a emergência da onda folicular, e o folículo dominante nesta fase atinge em média um tamanho de 8,5 mm e 7,2 mm para o segundo folículo maior (GINTHER et al., 1996). Já em novilhas da raça Nelore, a divergência apresenta-se por volta de 2,5 a 2,7 dias pós-ovulação, com o tamanho do folículo dominante que pode variar entre 5,4 mm (SARTORELLI et al., 2005), 5,9 mm (CASTILHO et al., 2006) e 6,2 mm (GIMENES, 2006) enquanto, o diâmetro do segundo folículo maior teve uma variação entre 5,3 mm (SARTORELLI et al., 2005) a 5,8 mm (GIMENES, 2006).

Poucas horas antes da divergência folicular (16 horas), a concentração plasmática de FSH declina (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1997; 1998; 1999) cessando o crescimento dos folículos subordinados. O intervalo entre o pico e o

decréscimo dos níveis plasmáticos de FSH tem uma duração de aproximadamente 3 dias, sendo o declínio necessário para a estabilização da divergência folicular (GINTHER et al., 2003).

A alteração no padrão de secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) leva ao declínio de FSH pela adenohipófise, sendo mediado pela ação do estradiol que é secretado pelo folículo dominante, junto com a produção de outros hormônios que influenciam diretamente o desenvolvimento folicular como a inibina, activina e a folistatina (BONDENSTEINER, 1996; GINTHER et al., 1996; 1997). Estes hormônios agem de maneira conjunta e são produzidos pelas células da granulosa dos folículos. A activina estimula a produção dos receptores de FSH presentes nas células da granulosa (GLISTER et al., 2006), já a inibina estimula o aumento dos andrógenos produzidos pelas células da teca, e a folistatina é considerada como o regulador negativo da activina (PATEL et al., 2007).

A activina está presente nos folículos, nas fases de recrutamento, seleção e dominância, pois estes folículos estão em constante crescimento, influenciados pela presença de FSH (BEG e GINTHER, 2006). Já a inibina e a folistatina estão presentes no folículo dominante, exercendo um efeito inibitório sobre o desenvolvimento dos folículos subordinados (GLISTER et al., 2006).

A estreita relação entre o FSH e os folículos no mecanismo do desvio folicular, pode ser considerada um componente de grande importância, envolvendo outros mecanismos, assim como a produção de fatores pelo folículo dominante que inibem diretamente os outros folículos de ambos os ovários (GINTHER et al., 2003). Desta maneira, o folículo dominante permanece funcional por alguns dias após atingir o tamanho máximo e então sofre atresia. A perda da funcionalidade do folículo dominante resulta em um aumento transitório de FSH, o qual estimula a emergência de uma nova onda folicular (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1996; 1997).

A expressão dos receptores das gonadotrofinas e as enzimas esteroideogênicas, estão associadas principalmente, com o desenvolvimento dos folículos (BAO et al., 1997; ABDENNEBI et al., 1999). Os receptores para FSH foram localizados especificamente nas células da granulosa (BAO et al., 1997; BAO e GARVERICK, 1998; ABDENNEBI et al., 1999), no entanto, a ligação do FSH com os seus receptores, induz a expressão dos receptores de LH na membrana das células da granulosa.

Após as mudanças na dependência gonadotrófica dos folículos selecionados, os mecanismos envolvidos na função do LH estão associados à fase final do crescimento do folículo dominante (GINTHER et al., 1996) e na maturação folicular (DODE, 2006). As concentrações de LH apresentam uma elevação transitória entre 24 a 32 horas antes da divergência folicular (GINTHER et al., 1998; KULICK et al., 1999), mantendo-se elevadas até por um período de 48 horas após o desvio (BERGFELT et al., 2000; GINTHER et al., 2001).

O aumento da concentração de LH ativa as células da teca, estimulando a síntese dos andrógenos que serão aromatizados posteriormente em estradiol pelas células da granulosa (GINTHER et al., 2001; MIHN e BLEACH, 2003). O aumento na secreção de estradiol no momento da divergência folicular, leva a uma diminuição na circulação de FSH, facilitando a dependência intrafolicular do folículo dominante pelo LH (GINTHER et al., 1996). Por isso, considera-se que uma das funções do LH está relacionada à esteroidogênese e liberação de fatores de crescimento (GINTHER et al., 2003).

Estudos anteriores verificaram que a supressão na secreção de LH não permite o crescimento dos folículos entre 7 – 9 mm, indicando a necessidade deste hormônio para o crescimento e desenvolvimento dos folículos pós-desvio (GONG et al., 1995; 1996).

O aumento do LH na circulação estimula as células da granulosa dos folículos grandes a partir de 8 mm de diâmetro, na expressão do RNAm para receptores de LH (LHR) (XU et al., 1995; BAO et al., 1997; AERTS e BOLS, 2010). Outros estudos observaram que a expressão dos receptores apresenta-se entre 2 a 4 dias após a emergência da onda de crescimento folicular ou ovulação (BONDENSTEINER, 1996). BEG et al. (2001) e GINTHER et al. (2001) mostraram que a expressão de LHR ocorre 8 horas antes do início da divergência folicular, sendo sugerido por estes autores que a expressão precoce de LHR, poderia ser causa da dominância folicular.

Além das diferenças citadas anteriormente, no número de ondas foliculares presentes no ciclo estral, já foi descrito também, que fêmeas de raças zebuínas apresentam um recrutamento maior de folículos quando comparado com fêmeas de raças taurinas ($33,4 \pm 3,2$ vs $25,4 \pm 2,5$, respectivamente) (CARVALHO et al., 2008). Essas particularidades na dinâmica ovariana podem influenciar diretamente a eficiência dos programas de transferência de embriões e a aplicação da técnica de aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões, proporcionando

vantagem quando utilizadas fêmeas de raças zebuínas (BARUSELLI et al., 2007). Por tal motivo, é importante realizar uma adequada escolha das doadoras para alcançar máxima eficiência na aplicação de programas de reprodução assistida.

3.4 IMPORTÂNCIA DE PROGESTERONA NA REGULAÇÃO DO CICLO ESTRAL

A progesterona é um hormônio esteroide secretado pelas células luteínicas, placenta e glândula adrenal. Na maioria dos mamíferos, após a ovulação as células da granulosa remanescentes formam as células luteais grandes que produzem altas quantidades de progesterona (SANGHA et al., 2002) e ocupam aproximadamente, 70% da área total do corpo lúteo e secretam mais de 85% da progesterona (SALLES e ARAÚJO, 2010). Já as células da teca dão origem às células luteais pequenas que liberam baixas quantidades de progesterona (SANGHA et al., 2002) e constituem aproximadamente, 20 a 30% do volume do corpo lúteo (SALLES e ARAÚJO, 2010).

Os principais efeitos de progesterona produzida pelo CL são observados no sistema reprodutivo e no eixo hipotalâmico-hipofisário exercendo um mecanismo de retroalimentação negativa, controlando a secreção de GnRH e LH (MIHM et al., 2002). As funções de progesterona no trato reprodutivo estão relacionadas com a ovulação de um oócito de boa qualidade, manutenção da inatividade uterina para a preparação deste, caso haja gestação, desenvolvimento do concepto, sobrevivência do embrião e do feto, parto normal (INSKEEP, 2004) e manutenção da fase luteal do ciclo estral (FORDE et al., 2010). A progesterona regula o desenvolvimento folicular, através do controle da retroalimentação negativa sobre a secreção dos pulsos de LH (KINDER et al., 1996), inibindo assim a ovulação e permitindo a emergência das ondas foliculares (SAVIO et al., 1993). No entanto, a progesterona não tem capacidade de suprimir a secreção de FSH, o que permite a continuidade das ondas foliculares em presença de um corpo lúteo funcional (ADAMS et al., 1992).

Em fêmeas bovinas, o CL funcional está presente em média do 4º ao 17º dia do ciclo estral. Caso não sejam detectados sinais de reconhecimento materno da gestação em quantidades suficientes, devido a alguma falha no desenvolvimento inicial embrionário ou por ausência de fertilização do oócito, torna-se necessária a

regressão do CL como consequência à liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FORDE et al., 2010). Tal processo fisiológico determina uma diminuição na concentração plasmática de progesterona, possibilitando assim aumento na frequência dos pulsos de LH, o que estimula a continuidade do crescimento do folículo dominante que passa posteriormente, a ter capacidade de secretar estradiol e inibina para finalmente ocorrer a ovulação (IRELAND et al., 2000).

O aumento progressivo que a progesterona apresenta durante a fase luteal, tem a capacidade de regular a expressão dos seus próprios receptores no epitélio endometrial (KIMMINS e MAcLAREN, 2001), apresentando também, ação luteotrófica por modular sua própria síntese mediante um mecanismo de retroalimentação positiva (KOTWICA et al., 1998). A ligação de progesterona aos seus receptores é considerada maior nas células luteínicas grandes que nas pequenas, indicando que a progesterona apresenta função parácrina/autócrina na fase luteínica (GIOMETTI et al., 2009).

A progesterona em conjunto com a ocitocina e estradiol, regulam a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada pelas células endometriais, desencadeando o mecanismo luteolítico (GOFF, 2004). Durante a primeira metade do ciclo estral, altos níveis de progesterona inibem a expressão de genes que sintetizam o estradiol e os receptores de ocitocina localizados no endométrio, evitando a liberação prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$, evento associado ao ciclo estral de curta duração, devido a luteólise prematura (SPENCER et al., 2004). Entretanto, nesta primeira fase do ciclo estral, a alta exposição de progesterona estimula o acúmulo de ácido araquidônico, substância que pode ser transformada em prostaglandina G_2 , precursor imediato da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2), mecanismo que pode antecipar também a luteólise (GOFF, 2004). Já durante a segunda metade do ciclo estral, apresenta-se diminuição gradual na circulação de progesterona, devido a própria regulação que a progesterona exerce aos seus receptores, levando assim, a um incremento da secreção de ocitocina, o que permite ao endométrio passar a ter capacidade de secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$ e desencadear o mecanismo luteolítico (SPENCER e BAZER, 1995). Além disso, foi descrito que a progesterona tem uma participação no estímulo da síntese de prostaglandina E_2 (KOTWICA et al., 1998), substância considerada como fator luteotrófico e antiluteolítico na primeira metade da fase luteal (XIAO et al., 1998).

De acordo a concentração plasmática de progesterona, foi observado no dia do estro valores < 1 ng/mL, aumentando a partir do terceiro dia, atingindo valores máximos de 4,2 ng/mL no 12° dia do ciclo estral (SANTIAGO, 2001). Outros trabalhos acharam concentrações de progesterona nos três primeiros dias após a ovulação < 1 ng/mL, sendo observado um aumento progressivo na concentração de 3 ng/mL no 6° do ciclo estral, enquanto, a concentração máxima foi registrada com valores > 4 ng/mL entre o 10° e 14° dia pós-ovulação (ADAMS et al., 2008).

Em vacas da raça Nelore foram registrados concentrações médias de progesterona de 7,5 ng/mL, variando de 3,6 a 7,6 ng/mL entre o 7° e 15° do ciclo estral (ADEYEMO e HEATH, 1980; JIMÉNEZ et al., 1988). Já BORGES (2003) observou valores de progesterona variando entre 3,5 a 5,9 ng/mL no 12° e 14° do ciclo estral

Do mesmo modo, em novilhas e vacas da raça Holandesa, foram encontradas concentrações de progesterona < 1 ng/mL nos três primeiros dias do ciclo estral, enquanto, o pico máximo foi registrado para ambas as categorias de animais no 14° do ciclo estral (4 ng/mL para as vacas e 6 ng/mL para as novilhas) (SARTORI et al., 2004).

FAIR e LONERGAN (2012) observaram, que a diminuição dos níveis plasmáticos de progesterona leva ao pico de liberação de LH, hormônio responsável pela indução da luteinização das células da granulosa e da teca, expansão do complexo *cumulus*-oócito, maturação oocitária, ovulação e mudanças no ambiente endócrino folicular, onde as células da granulosa deixam de secretar estradiol e passam a secretar progesterona no líquido folicular (DIELEMAN et al., 1983), constituindo cerca de 90% do total dos esteroides intrafoliculares (OSBORN e MOOR, 1983).

CERRI et al. (2011b) determinaram o efeito da variação na concentração plasmática de progesterona durante o crescimento do folículo ovulatório sobre as concentrações de LH, estradiol, metabólitos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) e concentração no fluído folicular de IGF-1. A redução da concentração de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório teve maiores efeitos sobre a dinâmica folicular, provavelmente mediado pelas mudanças na concentração plasmática de LH, aumentando os níveis de estradiol, e diminuindo a concentração de IGF-1 no fluído folicular. Além disso, os autores descrevem que a redução dos níveis de progesterona induz o efeito prematuro de retroalimentação positiva sobre os receptores de estradiol, aumentando a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ através de mudanças na

liberação de ocitocina, incrementando desta maneira, os riscos de luteólise prematura. O estudo também sugere que os oócitos que se desenvolvem sob baixas concentrações de progesterona, são expostos a altas concentrações de estradiol, o que pode afetar a qualidade oocitária.

3.5 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E DA OVULAÇÃO

O controle farmacológico do ciclo estral é baseado na manipulação endócrina e alterações hormonais simulando eventos fisiológicos que ocorrem nas fêmeas. Este controle é baseado em três abordagens principais: regressão folicular pela aplicação de estradiol, indução da luteólise pela aplicação de análogos de PGF_{2α} e administração de progesterona ou seus derivados sintéticos, simulando a função do corpo lúteo. O uso de progesterona exógena mimetiza eventos fisiológicos, tais como, bloqueio do pico pré-ovulatório de LH e supressão de estro, porém, sua administração simula a fase luteínica do ciclo estral, regula a secreção pulsátil de LH e permite a ocorrência das ondas foliculares (LARSON e BALL, 1992).

A importância de progesterona na reprodução bovina foi primeiramente descrita por FONSECA et al. (1983), os quais descreveram que elevadas concentrações de progesterona durante 12 dias antes da inseminação, foi relacionado com altas taxas de concepção em vacas leiteiras. Assim, foi indicado que elevados níveis de progesterona antes da inseminação artificial tiveram um efeito positivo na melhora da fertilidade de vacas leiteiras e uma das possíveis causas de baixa fertilidade, pode ser, devido a concentrações reduzidas de progesterona antes da inseminação (INSKEEP, 2004; WILTBANK et al., 2011). O estudo mostrou a importância de altos níveis de progesterona durante o crescimento do folículo ovulatório. Os animais que iniciaram o protocolo Ovsynch com alta concentração de progesterona (>1 ng/mL) apresentaram maior taxa de prenhez (43,0%) quando comparado com os animais de baixa concentração de progesterona (<1 ng/mL) (31,3%) (BISINOTTO et al., 2010). Estes resultados mostraram que altos níveis de progesterona durante o crescimento

do folículo ovulatório, aumentam a fertilidade em vacas leiteiras em mais de 10% após a inseminação artificial (FAIR e LONERGAN, 2012; WILTBANK et al., 2012).

Apesar do efeito positivo observado em vários trabalhos que descrevem que altos níveis de progesterona melhoram o crescimento folicular e conseqüentemente, aumentam a fertilidade dos animais, PFEIFER et al. (2009b) não observaram diferença nas taxas de gestação de vacas e novilhas *Bos taurus*, submetidas a altas ou baixas concentrações de progesterona ($3,8 \pm 0,41$ vs $1,1 \pm 0,41$ ng/mL, respectivamente) durante o crescimento do folículo ovulatório. Contudo, o estudo relatou que baixos níveis de progesterona aumentam o diâmetro do folículo pré-ovulatório em resposta ao aumento na frequência dos pulsos de LH, hormônio responsável pelo crescimento do folículo dominante.

Estudos realizados em bovinos utilizaram progesterona sintética norgestomet (17 α -acetoxy-11- β -methyl-19-nor-preg-4-ene-3,20-dione), para sincronização do ciclo estral. Os resultados mostraram alta eficiência deste progestágeno na supressão do comportamento estral e ovulação (McGUIRE et al., 1990; HILL et al., 1992; MOFFATT et al., 1993; KESLER et al., 1995; MACHADO e KESLER, 1996; KESLER, 1997a;b).

A estrutura química de norgestomet é considerada idêntica à progesterona, com exceção de um grupo metil na posição 19 (Figura 1). Mas, o norgestomet apresenta duas modificações: a presença de um grupo metil na posição 11 e de um acetato na posição 17 (MACHADO e KESLER, 1996).

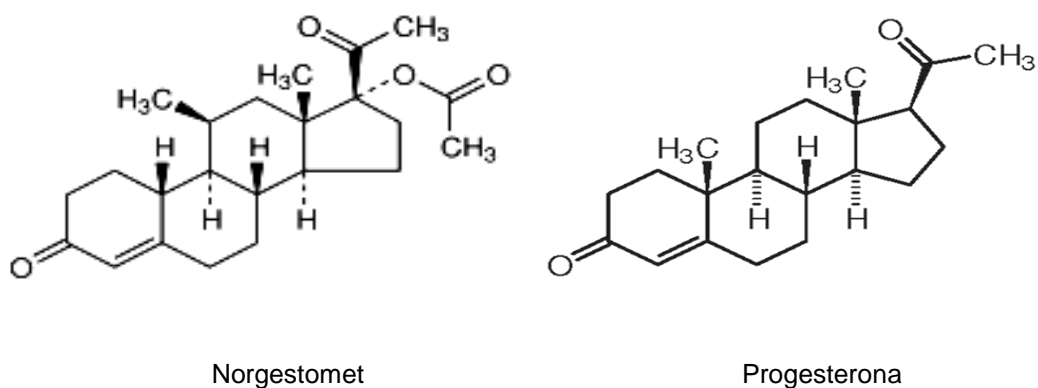


Figura 1. Estrutura química de norgestomet e de progesterona.

O norgestomet é considerado um hormônio de rápida metabolização, biologicamente ativo e excretado através da urina e fezes. GILBERT et al. (1974) revisado por MACHADO e KESLER, (1996) relataram que o norgestomet é 15 vezes mais biologicamente ativo que a progesterona quando administrada por via oral em coelhos e 216 vezes mais ativo que a progesterona quando aplicada por via subcutânea em camundongos. WISHART (1972) revisado por MACHADO e KESLER (1996) mostrou que 137 a 140 µg de norgestomet ou 45 mg de progesterona aplicados diariamente são requeridos para suprimir o estro em novilhas, motivo pelo qual os autores sugerem que o norgestomet consegue ser 321 vezes mais potente em bovinos quando comparado à progesterona.

Em um estudo mais recente foi constatado que os receptores de progesterona apresentam maior afinidade de ligação ao norgestomet em relação à própria progesterona ($14,2 \pm 0,9$ vs $1,1\% \pm 0,9$, respectivamente). Os autores relatam que essa propriedade apresentada pelo norgestomet é devido a uma eficiente competência de ligação aos receptores de progesterona (PERRY et al., 2005).

Os primeiros trabalhos realizados entre as décadas de 70 e 80 (revisado por TAYLOR et al., 1993) relataram o uso de norgestomet em bovinos em associação ao valerato de estradiol para o controle e a sincronização do ciclo estral. Sendo nesses primeiros estudos detectadas baixas taxas de gestação. TAYLOR et al. (1993) avaliaram o uso de norgestomet em novilhas Holandesas na fase luteal e na fase folicular do ciclo estral. Os resultados mostraram que o norgestomet mantém o crescimento do folículo ovulatório, sem afetar a emergência das ondas foliculares. De igual maneira, o norgestomet não afetou o padrão de secreção de LH durante a fase luteal e folicular, sendo observado na primeira fase pulsos de baixa frequência e alta amplitude. Entretanto, na fase folicular o padrão de secreção de LH apresentou-se com pulsos de alta frequência e baixa amplitude.

Em novilhas de corte *Bos taurus*, avaliaram o efeito de um, dois, quatro e oito implantes de norgestomet sobre a frequência de secreção dos hormônios LH e estradiol. Os autores observaram que as novilhas que receberam dois, quatro e oito implantes de norgestomet tinham os pulsos de LH suprimidos. Já em relação à concentração plasmática de estradiol os resultados mostraram que o grupo com um implante de norgestomet teve maiores concentrações do hormônio esteroide, aumentando a taxa de crescimento e o tamanho do folículo dominante (SANCHEZ et al., 1995).

GARCIA et al. (2004) verificaram que novilhas Holandesas submetidas a protocolos de sincronização de estro e da ovulação, associando norgestomet e GnRH, foram efetivos na indução de uma nova onda de crescimento folicular. SÁ FILHO et al. (2005) verificaram que a dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com implantes auriculares de norgestomet, promoveu incremento na taxa de crescimento folicular e no diâmetro do folículo dominante, aumentando a taxa de ovulação e sincronia das ovulações, quando comparado a dispositivos intravaginais de progesterona.

3.6 IMPORTÂNCIA DE PROGESTERONA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

Com o intuito de melhorar a produção de embriões *in vitro*, estudos foram realizados adicionando 300 nmol/L progesterona ao meio de maturação (SILVA e KNIGHT, 2000). Os resultados do estudo indicaram que a adição de progesterona diminui a competência para o desenvolvimento dos oócitos após a clivagem, sendo a taxa de blastocisto menor em relação ao grupo não tratado ($21,0 \pm 3$ vs $35,0\% \pm 4$). Por conseguinte, o trabalho ressalta que a adição de progesterona na maturação *in vitro* aumenta significativamente a secreção endógena de inibina- α , hormônio que tem a capacidade de inibir o potencial de desenvolvimento dos oócitos.

APARICIO et al. (2011) acrescentaram ao meio de maturação 50 ou 100 ng/mL de progesterona, mas, não foi obtido efeito significativo no desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto no D8) quando comparado com o grupo controle ($40,0 \pm 4,5$, $39,0 \pm 4,0$ e $42\% \pm 2,6$, respectivamente). Além disso, os autores identificaram a expressão de receptores de progesterona nos complexos *cumulus*-oócitos (PGR-A e PGR-B) durante o período de maturação, sugerindo uma importante ação local da progesterona e dos seus receptores no mecanismo de maturação oocitária com o reinício da meiose. O estudo também destaca que os hormônios FSH, LH e progesterona, regulam a expressão dos receptores da própria progesterona durante a maturação *in vitro*. De maneira similar aos resultados citados anteriormente, AKISON e ROBKER (2012) descreveram que tanto a

progesterona quanto os seus receptores, contêm um impacto positivo sobre a competência para o desenvolvimento dos oócitos em atingir o estágio de blastocisto.

PELUSO e PAPPALARDO, (1998) cultivaram células da granulosa de camundongos utilizando meio suplementado com progesterona. Os autores descreveram pela primeira vez que a adição de progesterona no cultivo deste tipo de células e a expressão dos seus próprios receptores, podem estar relacionadas a um efeito antiapoptótico das células da granulosa, regulando assim várias outras funções ovarianas. Pesquisas recentes verificaram que o período que corresponde à maior atividade na secreção de progesterona pelos complexos *cumulus*-oócitos está entre 10 a 22 horas de maturação *in vitro*, período no qual ocorrem os eventos de expansão das células do *cumulus* e apoptose (SALHAB et al., 2011). O trabalho mostrou, que após 10 horas da maturação *in vitro* ocorre a expressão dos receptores de progesterona e liberação da proteína denominada clusterina, apresentando atividade antiapoptótica durante as primeiras horas da maturação *in vitro*. Contudo, o estudo propõe que a produção de progesterona está relacionada à inibição da apoptose das células do *cumulus* e à alta competência dos oócitos, através de vias associadas com a fosforilação das proteínas tais como: SMAD2, JNK e AKT (SALHAB et al., 2011). De acordo com FAIR e LONERGAN (2012), provavelmente o efeito antiapoptótico da progesterona não está relacionado a uma única via (processos morfológicos ou bioquímicos), mas pode ser atribuído à regulação de várias vias ou processos que ocorrem durante a maturação oocitária.

3.7 INFLUÊNCIA DO GRUPO GENÉTICO NOS PROGRAMAS OPU-PIV

O primeiro relato do uso da técnica de aspiração folicular de oócitos bovinos foi realizado mediante uma abordagem transcutânea, descrita por CALLESEN et al. (1987).

PIETERSE et al. (1988) modificaram a técnica de recuperação de oócitos para ser empregada na espécie bovina, por via transvaginal com auxílio de ultrassom, denominada de aspiração folicular guiada por ultrassonografia, com o objetivo de produzir um número maior de embriões e mais gestações por doadora do que

através de protocolos de superovulação (DELLENBACH et al., 1984; COHEN et al., 1986; LENZ et al., 1987). Posteriormente, PIETERSE et al. (1991) denominaram a técnica de “ovum pick-up” (OPU). A partir desse ano a punção de folículos imaturos de ovários de doadoras vivas apresentou uma rápida difusão e trouxe novas perspectivas aos programas de reprodução assistida, pois uma maior quantidade de oócitos tornou-se disponível para a produção *in vitro* de embriões (BOLS et al., 2005).

Dentre as reconhecidas vantagens da OPU está o fato da obtenção de oócitos em qualquer fase do ciclo estral sem tratamento hormonal (MERTON et al., 2003), possibilitando realizar repetida recuperação de oócitos de animais vivos sem trauma aparente do trato reprodutivo. Por ser uma técnica pouco invasiva, permite a produção de embriões oriundos de vacas senis (BROGLIATTI e ADAMS, 1996), com patologias reprodutivas adquiridas (LOONEY et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995), vacas prenhes (BUNGARTZ et al., 1995) e em novilhas pré-púberes (BROGLIATTI e ADAMS, 1996). Outra reconhecida vantagem na aplicação da técnica junto à FIV é a maximização no uso do sêmen, permitindo maior produção de embriões com uma única dose, que pode ser de alto valor econômico e inclusive sêmen sexado (FABER et al., 2003). No entanto, uma das principais desvantagens da técnica refere-se ao seu alto custo. Mesmo assim, o seu uso é plenamente justificado quando realizado em animais de alto mérito genético e valor comercial (GALLI et al., 2001). Segundo van WAGTENDONK-de LEEUW (2006), o custo de um embrião por OPU-PIV é aproximadamente duas vezes maior em relação aos embriões por TE convencional.

Através da associação da OPU-PIV, os resultados obtidos em relação à taxa de clivagem oscilam entre 60 e 80% (CHAUHAN et al., 1999) e 30 a 40% tem a capacidade de atingir o estágio de blastocisto (HASLER et al., 1995; 1998). Contudo, o progresso conquistado nos últimos anos pode ser considerado baixo, assim, as atuais pesquisas buscam encontrar mecanismos que proporcionem melhores condições em relação à qualidade dos oócitos coletados e sistemas de cultivo, que visem aumentar a competência para o desenvolvimento dos oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

O número de oócitos recuperados por doadora sofre uma grande variação individual por fatores biológicos e mecânicos. Segundo KRUIP et al. (1994), existe uma variação entre doadoras com uma oscilação de 9 a 26%, entretanto, HASLER

et al. (1995) relataram uma variação de 4 a 33% e DAYAN (2001) obteve variação entre 14 e 54%.

Entre os fatores que podem influenciar os programas OPU-PIV é possível considerar fatores mecânicos tais como: aparelho de ultrassom (BOLS et al., 1995; 2004; GALLI et al., 2001), domínio da técnica de aspiração pelo operador (SCOTT et al., 1994), pressão da bomba de vácuo (BOLS et al., 1995; HASHIMOTO et al., 1999), tipo de agulha utilizada (BOLS et al., 1995; 2004; HASHIMOTO et al., 1999; GALLI et al., 2001) e frequência de aspiração (KRUIP et al., 1994; REICHENBACH et al., 1994; HASLER et al., 1995; MERTON et al., 2003). Entre os fatores biológicos é possível destacar a raça (LOONEY et al., 1994; DE ARMAS et al., 1994), a idade (GALLI et al., 2001; MERTON et al., 2003), o estado reprodutivo (BUNGARTZ et al., 1995), a fase do ciclo estral (PIETERSE et al., 1991; MACHATKOVÁ et al., 1996), o estado nutricional (OLIVEIRA et al., 2002) e o estresse térmico (WOLFENSON et al., 1995; KRININGER III et al., 2003, TORRES-JÚNIOR et al., 2008).

Estudo realizado em vacas da raça Gir (*Bos indicus*), apresentou alta variação na taxa de recuperação de oócitos em relação à frequência de aspiração folicular, foi mostrado que OPU uma vez por semana teve maior taxa de oócitos colhidos quando comparado com duas aspirações por semana (74,3 e 59%, respectivamente), porém, a taxa de oócitos grau I foi melhor para o grupo com duas OPU por semana (22,6%) em relação a uma aspiração por semana (13,3%). De modo similar, a porcentagem de blastocistos obtidos foi maior para o grupo de duas punções por semana em relação a uma OPU por semana (31,8 vs 21,6%, respectivamente) (VIANA et al., 2004). Estudo mais recente em animais do mesmo grupo genético apresentou variação na recuperação de oócitos de 4,4 a 7,0 estruturas, com taxa de oócitos grau I entre 8 e 13,6%, e taxa de oócitos viáveis entre 40 e 63,6% (VIANA et al., 2010). Trabalhos subsequentes em vacas Nelore (PONTES et al., 2009; 2011) obtiveram em média para cada sessão de OPU: 30 oócitos recuperados, 23,3 oócitos viáveis e 8,1 embriões transferíveis.

Em um estudo comparativo entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, GIMENES (2010) observou o efeito da aspiração folicular realizada em 1, 3 e 5 dias após a emergência da onda folicular, em relação à taxa de blastocisto de novilhas da raça Nelore e Holandesa. Os resultados mostraram melhor taxa de blastocisto em novilhas Nelore quando comparado às Holandesas nos dias mencionados anteriormente (28,1, 28,4 e 28,4% vs 16,6, 15,7 e 10%, respectivamente). Esses

resultados são consistentes com os obtidos por ESCALONA et al. (2008), os quais compararam a taxa de blastocisto de oócitos oriundos de ovários de matadouro de fêmeas Brahman e Holandesa (28,5 vs 17,5%, respectivamente). Ambos os estudos são conclusivos em ressaltar a melhor capacidade de adaptação das raças zebuínas ao estresse térmico, com a obtenção de oócitos de melhor qualidade e maior capacidade de desenvolvimento *in vitro* (ESCALONA et al., 2008; GIMENES, 2010).

Os primeiros trabalhos realizados em *Bos taurus*, relataram taxas de recuperação de oócitos de 2 a 3 estruturas por doadora por sessão (PIETERSE et al., 1988). BOUSQUET et al. (1999) recuperaram em média 4,7 estruturas por sessão e BORDIGNON et al. (1997) encontraram acima de 11 oócitos por sessão.

Estudos posteriores em doadoras *Bos taurus* (GOODHAND et al., 2000; SENEDA et al., 2001; PETYIM et al., 2003; RIZOS et al., 2005; DE ROOVER et al., 2008), relataram taxas de recuperação de oócitos com variação entre 37 a 72,2%, número de oócitos colhidos entre 2,6 a 6,1, estruturas e taxa de blastocisto entre 19 a 46,5%. RIZOS et al. (2005) em animais da raça Holandesa, obtiveram maior número de oócitos grau I e II em novilhas em relação às vacas (3 vs 1,8, respectivamente), com taxa de blastocisto maior nas vacas (46,5%) quando comparado às novilhas (33,4%).

Embora, não esteja esclarecida a razão porque as fêmeas da raça Nelore produzem um número maior de oócitos por sessão de OPU em relação às fêmeas de raças *Bos taurus* (PONTES et al., 2011). Estudo recente (SILVA-SANTOS et al., 2011) estimou a população de folículos pré-antrais em ovários de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, sendo utilizados ovários de fetos, novilhas e vacas. Os resultados do trabalho não mostraram diferença no número de folículos pré-antrais entre as diferentes categorias de ovários. Deste modo, uma possível explicação proporcionada por esse grupo de pesquisa, relata que mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular após o estágio pré-antral podem estar envolvidos aumentando o número de oócitos para fêmeas de raças *Bos indicus*. Outra hipótese sugerida pelo grupo de pesquisa de PONTES et al. (2011) relata que, vacas da raça Nelore apresentam menor taxa de atresia folicular. DISKIN et al. (2003) relataram que alguns hormônios metabólicos podem ser responsáveis pelo controle do desenvolvimento folicular (GH, IGF-1, insulina e leptina). ALVAREZ et al. (2000) constataram que fêmeas Brahman apresentaram maiores níveis circulantes de IGF-1 em relação a animais da raça Angus e Senepol, sendo o IGF-1 responsável por

estimular a função ovariana, agindo de maneira sinérgica com as gonadotrofinas, promovendo a esteroidogênese e crescimento folicular (LUCY, 2000; EL-SHERRY et al., 2010).

3.8 INFLUÊNCIA DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Vários protocolos hormonais têm empregados em doadoras de oócitos a fim de melhorar a taxa de recuperação dos complexos *cumulus*-oócitos e aquisição de competência para a produção *in vitro* de embriões. Dentre os protocolos realizados podem ser citados tratamentos com gonadotrofinas (BLONDIN et al., 1996; BLONDIN et al., 1997a;b; GOODHAND et al., 1999; 2000; REIS et al., 2002; CHAUBAL et al., 2007; SENDAG et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010; EL-SHERRY et al., 2010) e somatotropina bovina – bST (PIVATO et al., 1999; FERRAZ, 2008). Outros estudos têm avaliado tratamentos com progesterona exógena com o intuito de aumentar o número de folículos e oócitos recuperados, assim como a qualidade dos oócitos para o desenvolvimento *in vitro* (PFEIFER et al., 2009a).

Apesar dos protocolos de estimulação hormonal antes da OPU, promover aumento de tamanho dos ovários, tornando mais fácil sua manipulação (TECHAKUMPHU et al., 2004), além de estimular o crescimento folicular, sendo a aspiração destas estruturas mais fácil tecnicamente. No entanto, a eficiência da taxa de recuperação é significativamente baixa quando comparado com animais não tratados (BOLS et al., 1997). Alguns autores justificam a baixa taxa de recuperação destes oócitos a um estágio de maturação mais avançado e presença de líquido folicular mais viscoso e em maior quantidade, contendo camadas de células da granulosa que dificultam a aspiração destas estruturas (GOODHAND et al., 1999; SENEDA et al., 2001).

Normalmente, os oócitos utilizados em programas de produção *in vitro* de embriões, são originários de folículos entre 3 a 8 mm de diâmetro, sendo colhidos em diferentes estágios de desenvolvimento e atresia. Entretanto, a fase do ciclo estral que proporciona melhor qualidade e competência aos oócitos é considerada a

fase de diestro (fase com maior influência de progesterona), permitindo aos oócitos se desenvolverem melhor, em um ambiente com maior concentração de progesterona. Do mesmo modo, oócitos colhidos em fase folicular do ciclo estral são considerados menos competentes, devido à baixa concentração de progesterona que ocorre neste estágio (MACHATKOVÁ et al., 2004).

Alguns trabalhos mostraram que concentrações subluteais de progesterona são associadas ao aumento dos pulsos de LH, hormônio que estimula a esteroidogênese das células da granulosa, incrementando a atividade estrogênica e melhorando a expressão dos genes da enzima aromatase e formação de receptores para FSH e LH nas células da granulosa (PFEIFER et al., 2009b).

PFEIFER et al. (2009a) comprovaram o efeito de diferentes níveis de progesterona em doadoras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) sobre a qualidade dos oócitos e competência para o desenvolvimento *in vitro* de embriões. Os três níveis estabelecidos de progesterona foram: nível muito baixo <1 ng/mL (sem implante), nível baixo entre 1 e 2 ng/mL (inserção de um implante reutilizado) e nível alto >3 ng/mL (inserção de dois implantes novos). As doadoras foram sincronizadas previamente com implante intravaginal de progesterona, aplicação de PGF_{2α} e aspiração de todos os folículos maiores que 5 mm de diâmetro. A taxa de recuperação foi significativamente maior para o grupo com níveis altos de progesterona (68,8%) em relação aos grupos com níveis baixos e muito baixos (60,9 e 46,6%, respectivamente). Porém, a taxa de qualidade dos oócitos colhidos (grau I a III) foi maior para os grupos baixa progesterona e muito baixa progesterona quando comparado ao grupo alta progesterona (79,4, 72,3 vs 68,4%, respectivamente). De modo semelhante, o grupo com baixa progesterona foi significativamente maior na taxa de blastocistos (28,2%) em relação aos grupos alta (16%) e muito baixa progesterona (15%). A partir desse trabalho, foi considerado a importância de níveis adequados de progesterona capazes de influenciar a qualidade dos oócitos, fato que pode estar relacionado à frequência dos pulsos de LH e dos níveis de atresia. Os autores sugerem que baixos níveis de progesterona favorecem a pulsatilidade de LH e conseqüentemente, melhora na competência para o desenvolvimento *in vitro* dos oócitos até o estágio de blastocisto.

Estudo subsequente (EL-SHERRY et al., 2010) avaliou altos e baixos níveis circulantes de progesterona em vacas Holandesas, sendo verificado maior quantidade de folículos no 3º e 5º dia do ciclo estral para os animais com baixa

concentração plasmática de progesterona (20 e 22,8, respectivamente) em relação às doadoras com altos níveis plasmáticos de progesterona (11,3 e 11,6, respectivamente). Os resultados do trabalho mostraram que animais com baixos níveis de progesterona aumentaram os pulsos de LH, o que influenciou a dinâmica folicular e a esteroidogênese, estimulando a atividade da enzima aromatase e a secreção de estradiol. Em bovinos, o estradiol estimula o hipotálamo na liberação de outros hormônios tais como o hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH), estimulando assim, a secreção de GH (HASSAN et al., 2001; HAYASHI et al., 2008; SHIMIZU et al., 2008). Estudos mostraram que o GH promove a secreção hepática de IGF-1 (ALVAREZ et al., 2000; HAYASHI et al., 2008), substância associada a mecanismo de crescimento folicular (LUCY, 2000; EL-SHERRY et al., 2010).

BORCHERT et al. (1999) verificaram o efeito de norgestomet em vacas *Bos taurus*, durante a obtenção de folículos pré-ovulatórios persistentes com presença de norgestomet ou folículos pré-ovulatórios normais em ausência de norgestomet. Foi mostrado que a qualidade dos oócitos derivados de folículos pré-ovulatórios persistentes não difere dos folículos normais, no entanto, a expansão das células do *cumulus* foi significativamente maior nos folículos persistentes em relação aos normais. Entretanto, as taxas de blastocistos não apresentaram diferença entre ambos os grupos (22 vs 18,9%, respectivamente).

Desta modo, poucos trabalhos avaliaram o uso de norgestomet em doadoras de oócitos, sendo necessário verificar o efeito de norgestomet na qualidade dos oócitos e produção *in vitro* de embriões em animais submetidos a condições iguais de manejo e ambiente.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos implantes auriculares de norgestomet na sincronização da onda folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à aspiração folicular.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos implantes auriculares de norgestomet sobre:
 - População folicular no início e final dos tratamentos hormonais;
 - Taxa de recuperação;
 - Qualidade dos oócitos;
 - Taxa de blastocistos de vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado na EMBRAPA Gado de Leite, Campo Experimental Fazenda Santa Mônica – CEFSM, localizada no distrito de Barão de Juparanã, no município de Valença – RJ. O período experimental foi compreendido entre os meses de março e junho de 2012.

Foram utilizadas 12 vacas pluríparas, não lactantes, sendo seis fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*) e seis da raça Holandesa (*Bos taurus*), com idades variando entre 3 e 7 anos e escore de condição corporal de 3,5 a 4,0 na escala de 1 a 5 pontos (Figura 2).

Os animais foram submetidos a exame ultrassonográfico para detecção de ciclicidade, apresentando-se livres de Brucelose e Tuberculose, e devidamente vacinados contra Aftosa, Leptospirose, IBR e BVD.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em condições similares de pastagem (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*), com suplementação mineral e água *ad libitum*.



Figura 2. Vacas Gir (*Bos indicus*) e Holandesas (*Bos taurus*), doadoras de óocitos, Campo Experimental Fazenda Santa Mônica – CEFSM, EMBRAPA Gado de Leite, Valença – RJ, 2012.

5.2 ULTRASSONOGRAFIA DAS ESTRUTURAS OVARIANAS

As doadoras foram selecionadas através de exames ultrassonográficos transretais, realizados pelo mesmo técnico. Foi utilizado um aparelho de ultrassonografia modelo DP 2200 (Mindray VET, China), equipado com um transdutor endorectal linear (75L50EAV) com frequência 7,5 MHz. Foram realizados dois exames de ultrassonografia consecutivos, com intervalo de sete dias para detectar ciclicidade, registrando todos os folículos presentes, sendo selecionadas como doadoras aquelas que apresentaram CL.

Após a seleção das doadoras, exames ultrassonográficos foram realizados no início e no final de cada tratamento hormonal, registrando a variação da população folicular durante todo o período experimental.

Para uma visualização adequada dos ovários, foram capturadas as imagens utilizando-se o recurso “cineloop” para realizar o registro da população dos folículos pequenos (< 6 mm), médios (6 a 9 mm) e grandes (> 9 mm).

5.3 TRATAMENTO HORMONAL PARA A SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR

A emergência da onda folicular foi sincronizada em todos os animais por meio de tratamento hormonal esquematizado na Figura 3.

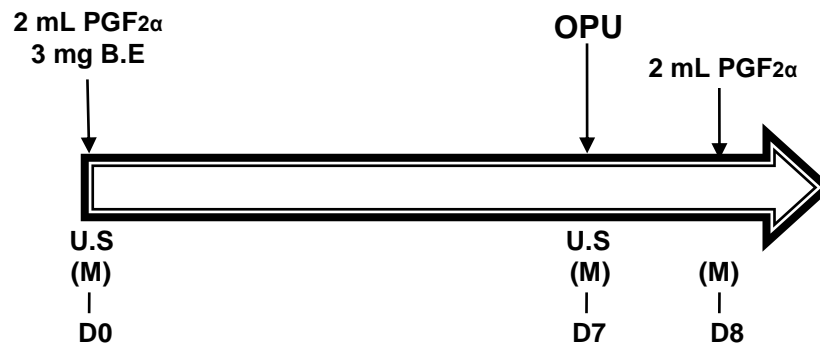
Os animais foram distribuídos em três tratamentos hormonais sendo aplicado 3 mg de benzoato de estradiol (RIC- BE[®], Tecnopec Ltda, Brasil) no dia 0 e a fim de eliminar a presença dos corpos lúteos e efeito de progesterona endógena, uma dose de 150 µg de D-cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec Ltda, Brasil) foi administrada no início e no final de cada tratamento hormonal (Figura 3).

- Tratamento controle – sem implante auricular de norgestomet;
- Tratamento norgestomet baixo – foi inserido um implante auricular de segundo uso contendo norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil);
- Tratamento norgestomet alto – foram inseridos dois implantes auriculares novos (3 mg de norgestomet cada implante), a uma concentração total de

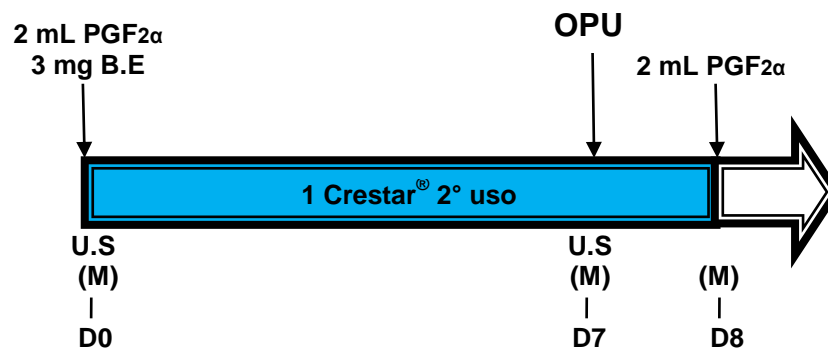
6 mg, associado a benzoato de estradiol e PGF₂ α como descrito no grupo anterior.

O procedimento de OPU foi realizado 7 dias após o início do protocolo de sincronização ou 3 dias após a emergência da nova onda folicular, sendo os implantes auriculares removidos após 24 horas.

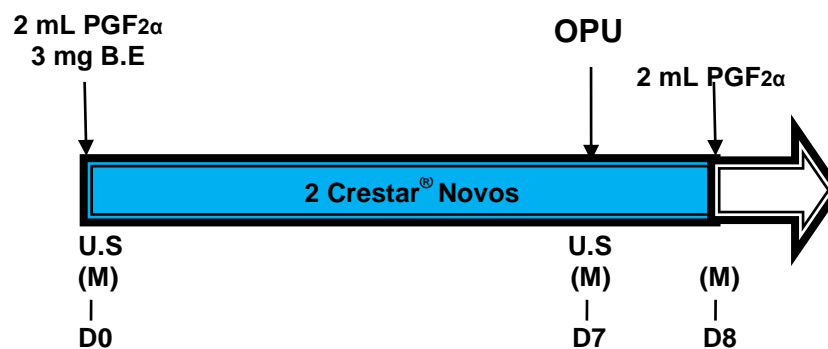
Cada um dos tratamentos hormonais incluíram 4 doadoras de cada grupo genético (duas vacas da raça Gir e duas da raça Holandesa) e a cada sessão de aspiração foram submetidas de forma alternada em todos os tratamentos “crossover”.



Tratamento controle



Tratamento norgestomet baixo



Tratamento norgestomet alto

Figura 3. Representação esquemática dos tratamentos hormonais associados a implantes auriculares de norgestomet (Crestar®), em vacas Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), Valença – RJ, 2012.

5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As avaliações ultrassonográficas realizadas previamente no início do experimento, permitiram distribuir de forma equilibrada os animais entre os tratamentos, conforme a população folicular visualizada.

Todas as doadoras passaram por todos os tratamentos com a finalidade de remover o efeito animal sobre os resultados do estudo. Desta maneira, o trabalho foi realizado em delineamento “crossover”. Os animais de ambos os grupos genéticos foram submetidos a seis sessões de aspiração folicular consecutivas, com intervalo entre aspirações de 14 dias e a cada OPU as vacas foram alternadamente submetidas em cada um dos tratamentos hormonais, sendo incluído neste período o tratamento de ressincronização da onda folicular (Figura 4).

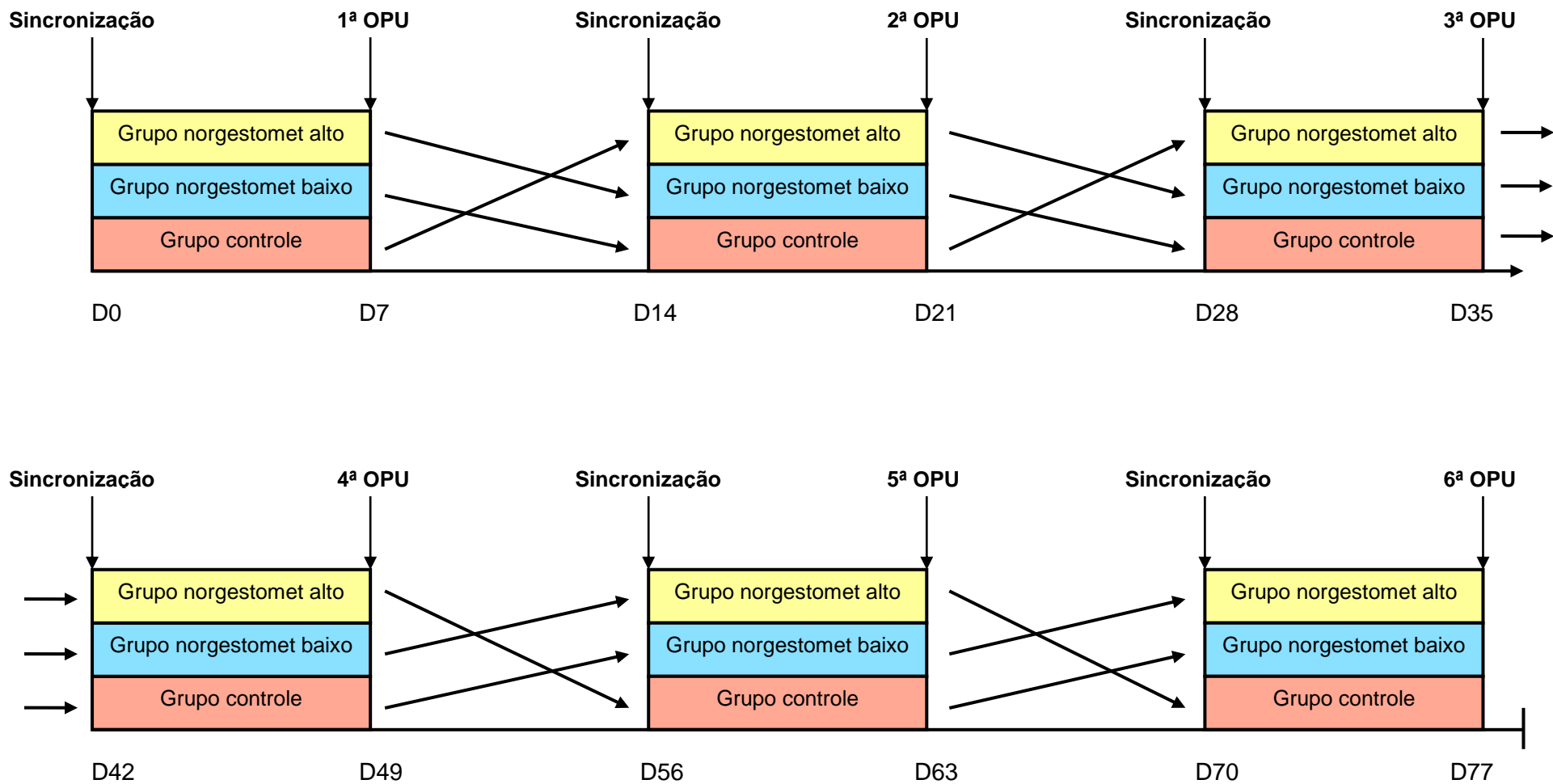


Figura 4. Representação esquemática do delineamento “crossover” alternado, com a utilização de implantes auriculares de norgestomet em vacas Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à aspiração folicular a cada 14 dias, Valença – RJ, 2012.

5.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA

Os animais foram contidos em brete, sendo feita a restrição dos movimentos pelo pescoço e flanco. Posteriormente foi realizada a remoção das fezes, seguida da limpeza e higienização da região perineal com água e sabão e secagem da área com papel toalha. No final deste procedimento foi realizada aspersão da região perineal com álcool 70%. Anestesia epidural foi realizada no espaço entre a última vértebra sacral e primeira coccígea, com uma associação de cloridrato de lidocaína e cloridrato de xilazina sem vasoconstritor (Bloc[®], J.A Saúde Animal, Brasil), em um volume total de 4 mL.

Previamente ao procedimento de punção folicular foi realizada a contagem dos folículos de ambos os ovários com auxílio de um aparelho de ultrassonografia DP 2200 VET (Mindray, China), equipado com um transdutor microconvexo (65C15EAV) com frequência de 7,5 MHz, acoplado a uma guia transvaginal para aspiração folicular.

A punção dos folículos foi realizada pelo mesmo técnico, com auxílio de uma agulha descartável para aspiração de 20 “G” (WTA-Vet, Brasil) acoplada a uma linha de aspiração de teflon (1,7 mm de diâmetro e 110 cm de comprimento) junto a um tubo cônico de 50 mL. Foi utilizado um tubo cônico para cada animal, contendo um volume de 5 mL de DPBS (DPBS[®], Vitrocell, Brasil), acrescido de 0,1% de heparina (Liquemine[®], Roche, Brasil), 1% de soro fetal bovino - SFB (Gibco BRL, Grand Island, NY) e antibióticos (penicilina G – 100 UI/mL e sulfato de estreptomicina – 100 µg/mL, Sigma-Aldrich Co, Estados Unidos). Esta solução estava previamente aquecida a 37°C. Os tubos foram conectados a uma bomba de vácuo com aquecedor de tubos (BV-003, WTA-Vet, Brasil) com uma pressão negativa de 70 mm/Hg (entre 13 a 15 mL de líquido/minuto).

As aspirações foram realizadas em ambos os ovários, em todos os folículos com diâmetro ≥ 3 mm. O fluido folicular coletado foi depositado em tubo cônico de 50 mL, e posteriormente transferido para um filtro EmCom (Agtech, USA). Foram acrescidos aproximadamente 100 mL de DPBS para remoção dos coágulos e células. O líquido contendo os oócitos foi transferido para placa de petri (100 x 20 mm) e os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs), apresentando pelo menos uma camada de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram selecionados. As estruturas foram lavadas

em meio 199 HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), 16 µg/mL de piruvato sódico e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil).

Foram considerados adequados para maturação *in vitro* os CCOs de grau I, II e III, enquanto as demais estruturas (desnudos, degenerados e expandidos) foram descartadas, sendo incluídas no cálculo de taxa de recuperação e número de oócitos totais.

Foi utilizado como critério de avaliação o aspecto citoplasmático quanto a cor, homogeneidade, integridade e número de camadas das células do *cumulus*. A classificação dos CCOs foi realizada conforme descrito por COSTA (1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição da classificação dos CCOs.

Categoria	Descrição
Grau I	Complexos <i>cumulus</i> -oócito compactos apresentando mais de três camadas de células do <i>cumulus</i> , oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Grau II	Complexos <i>cumulus</i> -oócito compactos apresentando menos de três camadas de células do <i>cumulus</i> , oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Grau III ou parcialmente desnudos	Complexos <i>cumulus</i> -oócito compactos apresentando até uma camada de células do <i>cumulus</i> .
Desnudos ou degenerados	Oócitos apresentando a maior parte ou totalidade de sua superfície sem células da granulosa e apresentando sinais de degeneração, como vacuolização intensa ou desintegração do citoplasma.
Expandidos	Complexos <i>cumulus</i> -oócito apresentando expansão das células do <i>cumulus</i> , com aumento do volume total e aspecto gelatinoso.
Zona pelúcida	Zona pelúcida rompida, sem conteúdo citoplasmático.

Fonte: COSTA (1997).

5.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

5.6.1 Maturação *in vitro*

Os CCOs de cada doadora foram lavados três vezes em gotas de 100 µL de meio de lavagem (meio 199 tamponado com HEPES e 10% de SFB) e transferidos separadamente para gotas de 100 µL (20 oócitos) de meio 199 tamponado com bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de SFB, 1,0 µg/mL de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50 µg/mL de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0 µg/mL de estradiol, 16 µg/mL de piruvato sódico, ITS (5 µg/mL de insulina-transferrina-selênio) e 83,4 µg/mL de amicacina, cobertas com óleo mineral estéril (Sigma-Aldrich Co, Estados Unidos). A maturação ocorreu em um período de 24 horas em estufa incubadora a 38,5°C, 5% CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

5.6.2 Preparo dos espermatozoides

Foi utilizado sêmen sexado de um único touro e partida da raça Gir e Holandês Preto e Branco (HPB), ambos com fertilidade conhecida. As palhetas foram descongeladas a 35°C durante 30 segundos, e o conteúdo foi vertido cuidadosamente sobre o gradiente de Mini-Percoll descontínuo (45 / 90) e centrifugado por 7 minutos a 800 x g. O sedimento foi ressuspenso em 1000 µL de meio FERT-TALP e centrifugado novamente por 5 minutos a 320 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso com meio FERT-TALP de forma a completar um volume final de 100 µL. A dose inseminante correspondeu a $1,0 \times 10^6$ espermatozoides / mL.

O sêmen do touro Gir foi utilizado para a fertilização dos oócitos das vacas Holandesas, e o sêmen do touro Holandês foi usado para a fertilização dos oócitos das vacas Gir.

5.6.3 Fertilização *in vitro*

Após a maturação, os CCOs (20 por cada gota) foram retirados da estufa e lavados três vezes em gotas de 100 μ L de meio FERT-TALP. Depois foram colocados com os espermatozoides em gotas de 50 μ L de meio FERT-TALP suplementado com 0,6% de BSA, 10 μ g/mL de heparina, 18 μ M de penicilamina, 10 μ M de hipotaurina, 1,8 μ M de epinefrina e cobertos com óleo mineral estéril.

Os CCOs permaneceram em cultivo junto com os espermatozoides por um período de 18 a 22 horas sob as mesmas condições empregadas na maturação.

5.6.4 Cultivo *in vitro*

Após o período de fertilização, os prováveis zigotos foram transferidos separadamente por doadora para gotas de 100 μ L de meio SOF, onde procedeu a remoção parcial das células do *cumulus* por pipetagem vigorosa. Após este procedimento as estruturas foram lavadas três vezes em gotas de 100 μ L de meio SOF e procedeu-se o cultivo dos prováveis zigotos em gotas de 100 μ L de meio SOF suplementado com 2,5% de SFB e 5 mg/mL de BSA recobertas com óleo mineral estéril por um período de sete dias, nas mesmas condições empregadas nas etapas da maturação e fecundação *in vitro*.

5.6.5 Avaliação da taxa de clivagem

Em um período de 72 horas pós-fecundação, 50% do volume de cada gota foi removido e substituído, utilizando-se o mesmo meio de cultivo citado anteriormente. Neste momento, foi determinada a taxa de clivagem dos embriões em cultivo.

5.6.6 Avaliação da taxa de blastocisto

Após sete dias da fecundação (D7) foi avaliada a taxa de blastocisto e avaliados os embriões de acordo com o estágio de desenvolvimento e grau de qualidade, segundo a classificação da IETS (STRINGFELLOW e GIVENS, 2010).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com auxílio do Software Analysis and Experimentation Group (SAEG, versão 9.1), através do aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas, foram obtidas as médias e erros padrão das variáveis: número de folículos pequenos, número de folículos médios, número de folículos grandes, número de folículos visualizados, número de oócitos recuperados, taxa de recuperação, número de oócitos grau I, número de oócitos grau II, número de oócitos grau III, número de oócitos desnudos, número de oócitos expandidos, número de oócitos degenerados, número de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, taxa de clivagem, número de blastocistos no dia sete, taxa de blastocistos. Foram considerados no modelo estatístico os 3 tratamentos (controle, norgestomet baixo e norgestomet alto), os grupos genéticos (Gir e Holandesas) e as seis sessões de aspiração folicular, sendo verificadas as influências destes fatores e suas interações mediante a análise de variância, e nos casos em que foi obtido efeito significativo ($P < 0,05$), foram comparadas as médias pelo teste de Tukey.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos dos fatores tratamento, grupo genético e sessão de aspiração folicular e suas respectivas interações estão apresentados na Tabela 2.

Houve efeito do tratamento na variável número de oócitos grau I ($P=0,05$) e número de blastocistos no dia sete ($P=0,04$). Em relação ao grupo genético apresentou-se efeito nas variáveis número de folículos visualizados ($P=0,0002$), número de oócitos recuperados ($P=0,013$), número de oócitos grau II ($P=0,0057$), número de oócitos grau III ($P=0,0067$), taxa de clivagem ($P=0,02$) e número de blastocistos no dia sete ($P=0,03$). Já na sessão de aspiração folicular foi observado efeito nas variáveis número de folículos visualizados ($P=<0,0001$), número de oócitos grau I ($P=0,03$), número de oócitos grau III ($P=0,006$), número de oócitos desnudos ($P=0,04$), número de oócitos expandidos ($P=0,001$), número de blastocistos no dia sete ($P=0,04$) e taxa de blastocisto ($P=0,006$).

Entretanto, houve interação entre tratamento x grupo genético na variável número de oócitos grau I ($P=0,05$) e número de blastocistos no dia sete ($P=0,03$). Já a interação tratamento x sessão de aspiração afetou ($P<0,05$) o número de folículos visualizados ($P=0,05$), número de oócitos desnudos ($P=0,003$) e número de blastocistos no dia sete ($P=0,00002$). Quanto à interação entre o grupo genético x sessão de aspiração, observou-se nas variáveis número de folículos visualizados ($P=0,04$), número de oócitos grau I ($P=0,04$), taxa de clivagem ($P=0,02$) e taxa de blastocisto ($P=0,05$).

Tabela 2. Efeito das variáveis tratamento, grupo genético e sessão de aspiração folicular e suas interações, Valença – RJ, 2012.

	EFEITOS (VALORES DE P)					
	Tratamento	Grupo genético	Sessão de OPU	Tratamento X Grupo genético	Tratamento X Sessão de OPU	Grupo genético X Sessão de OPU
Nº folículos visualizados	0,29	0,0002	< 0,0001	0,19	0,05	0,04
Nº oócitos recuperados	0,28	0,0013	0,33	--	0,23	--
Taxa de recuperação (%)	--	0,28	0,12	--	0,36	--
Nº oócitos grau I	0,05	0,31	0,03	0,05	--	0,04
Nº oócitos grau II	--	0,0057	--	--	0,37	--
Nº oócitos grau III	--	0,0067	0,006	--	--	--
Nº oócitos desnudos	0,20	0,11	0,04	--	0,003	--
Nº oócitos expandidos	--	0,83	0,001	--	--	0,13
Nº oócitos degenerados	--	0,82	0,42	0,12	0,35	--
Nº oócitos viáveis	--	0,01	--	--	0,22	0,09
Taxa de oócitos viáveis (%)	0,31	0,86	0,13	--	0,18	0,22
Taxa de clivagem (%)	--	0,02	0,19	--	--	0,02
Nº blastocistos no D7	0,04	0,03	0,04	0,03	0,00002	--
Taxa de blastocisto (%)	--	0,28	0,006	--	--	0,05

-- Valor de P não determinado.

6.1 EFEITO DO TRATAMENTO HORMONAL EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO FOLICULAR E EFICIÊNCIA DA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA

A população folicular durante os tratamentos hormonais das vacas Gir e Holandesas está representada na figura 5, respectivamente.

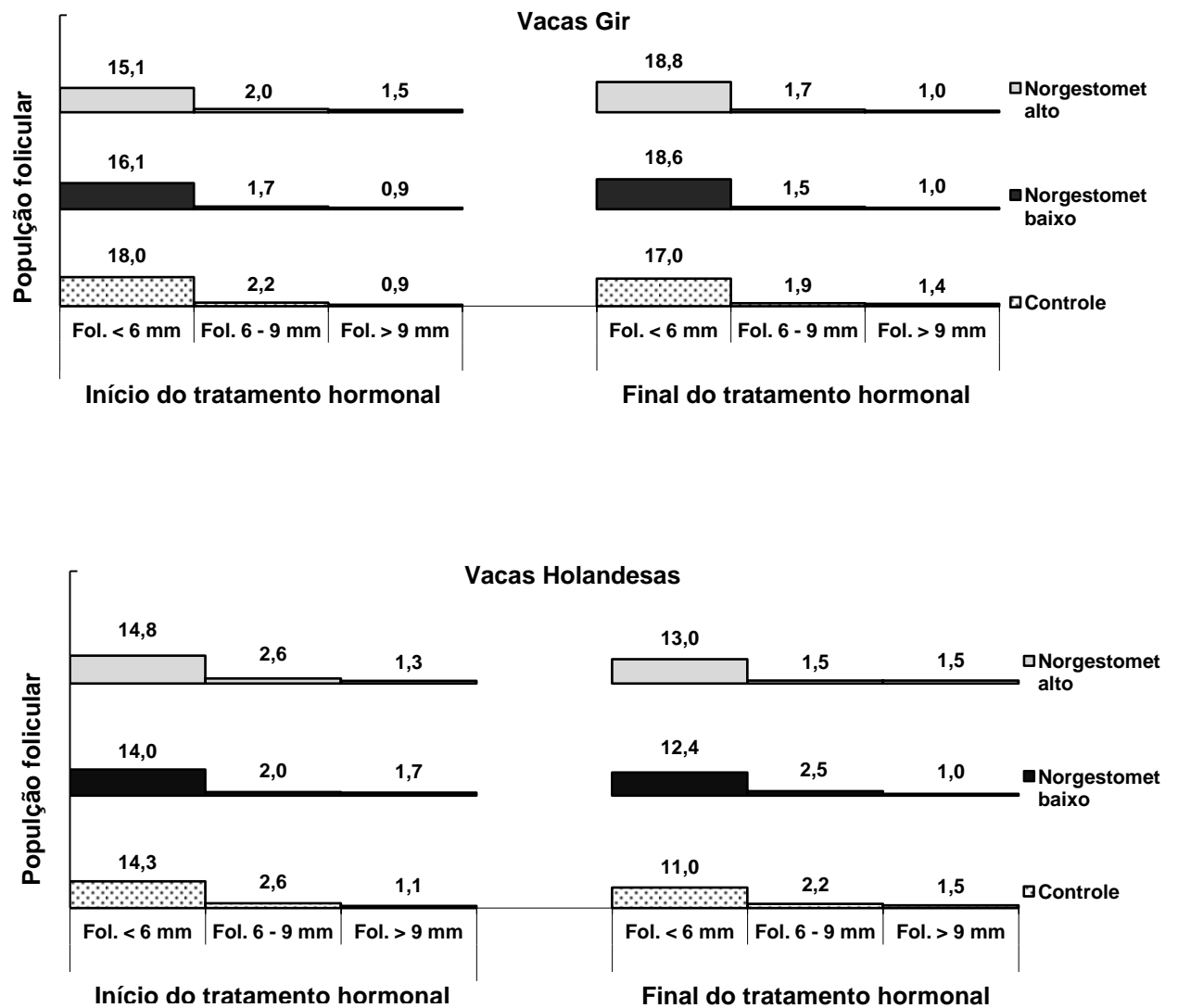


Figura 5. População folicular de vacas Gir (6) e Holandesas (6), no início e no final dos tratamentos hormonais.

O número total de folículos visualizados (população folicular) não foi influenciado ($P > 0,05$) pelo efeito dos implantes auriculares de norgestomet no início e no final dos tratamentos hormonais dos grupos controle, norgestomet baixo e norgestomet alto, tanto nas vacas da raça Gir, quanto nas Holandesas (Figura 5). A população folicular em bovinos, não está diretamente relacionada à aplicação de protocolos hormonais para a sincronização da onda folicular e sim a mecanismos inerentes das raças. Diferenças na população folicular entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, foram relacionadas a maiores concentrações circulantes de IGF-1 e insulina em raças zebuínas (ALVAREZ et al. 2000). SALES (2011) verificou maiores concentrações de IGF-1 no líquido folicular de vacas Gir, quando comparado com vacas Holandesas. Sabe-se que a insulina é um dos principais fatores que controlam a liberação e a biodisponibilidade de IGF-1. Desta maneira, especula-se que maiores concentrações de insulina e IGF-1 são responsáveis pelo maior número de folículos recrutados em zebuínos do que taurinos. Principalmente, por estes hormônios estarem aumentados na fase estrogênica, momento que ocorre o recrutamento dos folículos e emergência da nova onda folicular.

Outro possível mecanismo para tal evidência estaria relacionado à maior concentração sérica de progesterona durante o ciclo estral. Existem indícios que vacas de corte taurinas e vacas Holandesas em lactação com população folicular ≤ 15 estruturas visualizadas, apresentam de 30 a 50% menor concentração sérica de progesterona em relação a vacas com alta população folicular (≥ 25 folículos) (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009). Outros estudos verificaram que o maior metabolismo hepático dos hormônios esteroides apresentado em vacas Holandesas está diretamente correlacionado à alta ingestão de matéria seca e maior fluxo sanguíneo hepático (WILTBANK et al., 2006). Segundo GONG et al. (2002), alta ingestão de matéria seca pode aumentar ou até diminuir o número de folículos recrutados por onda (SARTORI et al., 2007). De acordo com esses resultados é provável que a baixa população folicular observada nas vacas Holandesas, esteja relacionada a maior metabolismo hepático de progesterona durante o ciclo estral. Outros estudos, atribuem essas diferenças a mecanismos relacionados com menores taxas de atresia dos folículos antrais das fêmeas *Bos indicus* em relação às *Bos taurus* (SILVA-SANTOS et al., 2011).

Tabela 3. Efeito da sincronização da onda folicular e número médio de folículos ovarianos de vacas Gir (*Bos indicus*) e Holandesas (*Bos taurus*) tratadas com benzoato de estradiol e prostaglandina ou benzoato de estradiol e prostaglandina associado a implantes auriculares de norgestomet, Valença – RJ, 2012.

	VACAS GIR				VACAS HOLANDESAS			
	Controle	Norgestomet baixo	Norgestomet alto	Valor de P	Controle	Norgestomet baixo	Norgestomet alto	Valor de P
Nº animais	2	2	2	-	2	2	2	-
Nº animais com folículo >9 mm no início do tratamento	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,41	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,32
Nº animais com CL no início do tratamento	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,30	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,35
Nº animais com CL no final do tratamento	0,5 ^a ± 0,1	0,1 ^b ± 0,1	0,0 ^b	0,02	0,5 ^a ± 0,1	0,7 ^a ± 0,1	0,08 ^b ± 0,1	0,01
Nº folículos pequenos (<6 mm)	17,0 ± 1,6	18,6 ± 1,3	18,8 ± 1,2	0,36	11,0 ± 1,2	12,4 ± 0,9	13,0 ± 1,0	0,43
Nº folículos médios (6 – 9 mm)	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,41	2,2 ± 0,5	2,5 ± 0,6	1,5 ± 0,4	0,52
Nº folículos grandes (>9 mm)	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,41	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,45
Nº folículos visualizados	20,4 ± 1,5	21,2 ± 1,3	21,6 ± 1,2	0,30	14,8 ± 1,2	16,0 ± 1,0	16,2 ± 0,9	0,49

Os dados estão descritos como média ± EPM.

^{a, b} Letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si, na variável do mesmo grupo genético, (P<0,05).

Os dados da Tabela 3 indicam que houve diferença significativa ($P=0,02$) para o número de animais com corpo lúteo no final do protocolo hormonal da raça Gir, do grupo controle em relação aos grupos norgestomet baixo e alto ($0,5 \pm 0,1$ vs $0,1 \pm 0,1$ e $0,0$). Entretanto, nas doadoras da raça Holandesa observou-se maior número de animais com corpo lúteo ($P=0,01$) dos tratamentos controle ($0,5 \pm 0,1$) e norgestomet baixo ($0,7 \pm 0,1$) quando comparado ao tratamento norgestomet alto ($0,08 \pm 0,1$). Esses achados mostraram que a aplicação exógena de $PGF_{2\alpha}$ no dia do início dos protocolos hormonais, talvez não tenha sido eficiente em promover o mecanismo luteolítico. Sendo possível que o corpo lúteo, tenha sido formado em decorrência a uma ovulação recente (menor a cinco dias), considerando-se ainda imaturo e não responsivo ao efeito de $PGF_{2\alpha}$, apresentando-se assim, falhas na luteólise.

Ainda que no presente trabalho não tenham sido realizadas avaliações ultrassonográficas diárias, para determinar o dia da emergência da nova onda folicular. De acordo com os resultados especula-se que a administração de estradiol em ausência de norgestomet (tratamento controle de ambos os grupos genéticos) pode estimular a liberação de GnRH/LH, causando a ovulação do folículo >9 mm presente no início do protocolo hormonal e como consequência a emergência da nova onda folicular de maneira não sincrônica. GIMENES (2006) mostrou que a capacidade ovulatória de fêmeas *Bos indicus* é adquirida por folículos $\geq 7,6$ mm de diâmetro. Já SARTORI et al. (2001) na espécie *Bos taurus* verificaram que a capacidade ovulatória é obtida por folículos com diâmetro ≥ 10 mm.

Está bem documentado que a aplicação de benzoato de estradiol tem sido utilizado como substituto do tratamento com GnRH para induzir a ovulação em bovinos. Sabe-se que a administração de benzoato de estradiol em presença de folículos FSH-dependentes, provoca atresia folicular promovendo redução das concentrações plasmáticas de FSH. Quando os níveis de benzoato de estradiol retomam aos valores basais, ocorre a emergência da nova onda de crescimento folicular em virtude do novo aumento de FSH (BÓ et al., 1995; 2000). Já quando aplicado em presença de folículos LH-dependentes, o benzoato de estradiol não induz atresia folicular, mas previne a emergência de uma nova onda até que tenha voltado a níveis basais. Mecanismo contrário apresenta-se quando o benzoato de estradiol é associado à progesterona ou aos progestágenos, adquirindo capacidade de induzir atresia dos folículos LH-dependentes.

Segundo GIMENES (2010), novilhas Nelore e Holandesas, sincronizadas com implante auricular de norgestomet mais benzoato de estradiol, o dia da emergência da onda folicular foi correspondente a $4,2 \pm 0,2$ e $4,4 \pm 0,2$ dias, respectivamente. No entanto, FERREIRA et al. (2009) observaram emergência da onda nos dias $3,9 \pm 0,2$, $3,5 \pm 0,2$ e $3,8 \pm 0,2$, para vacas em lactação, vacas secas e novilhas Holandesas, respectivamente. Os animais desse estudo foram previamente sincronizados com associação de um implante auricular de norgestomet, benzoato de estradiol e PGF 2α . Mais recentemente, BASTOS (2012) constatou que a emergência da onda folicular em *Bos indicus* e *Bos taurus*, é dose-dependente ao tratamento com benzoato de estradiol, sendo a emergência da onda folicular observada nos dias $3,0 \pm 0,1$, $3,3 \pm 0,2$ e $3,8 \pm 0,2$, para as doses de 1, 2 e 4 mg, respectivamente.

Dessa maneira, a adição de implantes auriculares de norgestomet de segundo uso e dois implantes novos ao protocolo de sincronização da onda folicular na raça Gir provavelmente promoveu atresia e emergência de uma nova onda folicular. Relatos de literatura são escassos quando se trata de implantes de norgestomet de segundo uso. ALMEIDA (2003) e MALUF et al. (2010) compararam as taxas de prenhez de vacas Nelore lactantes sincronizadas com um implante auricular de norgestomet novo ou um implante de segundo uso. Ambos os estudos concluíram que as taxas de gestação não foram afetadas quando aplicados implantes de norgestomet de segundo uso.

KESLER et al. (1995); MACHADO e KESLER, (1996) verificaram que implantes auriculares de norgestomet novos têm capacidade de liberação diária entre 137 a 140 μg , concentração necessária para inibir a manifestação de estro em bovinos. Embora no presente trabalho a concentração plasmática de norgestomet não tenha sido mensurada. Os resultados mostraram que o tratamento norgestomet baixo nas vacas Holandesas (grupo implante de segundo uso), apresentou maior número de animais com corpo lúteo no final do protocolo hormonal em relação ao grupo norgestomet alto. Esta diferença pode ser atribuída a que a utilização de implantes de norgestomet de segundo uso na raça Holandesa, para sincronizar a onda folicular, provavelmente não liberou os níveis de norgestomet requeridos por dia (entre 137 e 140 μg) para bloquear a secreção de LH e induzir a regressão dos folículos em associação com o benzoato de estradiol. Outra provável explicação, estaria relacionado a menores concentrações circulantes de progesterona em *Bos*

taurus (Angus e Holandês) em relação a *Bos indicus* (Nelore e Gir) (CARVALHO et al., 2008). Estas menores concentrações circulantes de progesterona podem ser decorrentes de um metabolismo maior dos hormônios esteroides em *Bos taurus*. SARTORI et al. (2004) verificaram que vacas Holandesas em lactação apresentam menor concentração sérica de progesterona e estradiol do que novilhas. Assim, as concentrações de ambos os hormônios para as vacas foram de $5,8 \pm 0,6$ e $7,3 \pm 0,8$, respectivamente. Já nas novilhas de $7,3 \pm 0,4$ e $11,4 \pm 0,6$, respectivamente. No entanto, BASTOS (2012) relatou que o maior metabolismo dos esteroides em vacas Holandesas pode ser uma característica inerente à raça e não apenas uma consequência da elevada ingestão alimentar.

Quanto às vacas Holandesas do tratamento norgestomet alto é possível ressaltar, que a inserção de dois implantes auriculares novos foram eficientes na sincronização da onda folicular, baseado nas estruturas ovarianas encontradas no final do protocolo hormonal. Desta forma, pode-se supor que dois implantes novos que contêm um total 6 mg de norgestomet, podem liberar mais de 140 µg de norgestomet ao dia, promovendo a supressão de estro e da ovulação.

Contudo, apesar de que não foi observada diferença significativa no número de animais com folículo >9 mm de diâmetro no final dos protocolos hormonais em ambos os grupos genéticos. É possível supor que a presença de folículo dominante foi promovida em decorrência ao aumento da frequência dos pulsos LH quando utilizados implantes auriculares de norgestomet. SANCHEZ et al. (1995) constataram que a inserção de um implante de norgestomet novo apresenta maior frequência nos pulsos de LH em um período de 24 horas ($19,6 \pm 0,6$) quando comparado com dois implantes ($14,0 \pm 1,7$) e sem implante ($14,4 \pm 1,9$). No mesmo estudo foi verificado que a taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia) foi superior quando inserido um implante em relação a dois ou sem implante ($1,68 \pm 0,04$ vs $1,20 \pm 0,04$ e $1,12 \pm 0,06$, respectivamente). PFEIFER et al. (2009a) detectaram maior concentração plasmática de LH nos animais tratados com um implante intravaginal usado em relação aos grupos de dois implantes novos e sem implante. Já HAYASHI et al. (2008) detectaram em vacas Holandesas que o tamanho do folículo dominante três dias após a emergência da nova onda folicular (pós-ovulação) apresentou $9,9 \pm 0,8$ mm de diâmetro, enquanto as concentrações plasmáticas de progesterona e LH foram <1 ng/mL e $1,6 \pm 0,06$ ng/mL, respectivamente. De acordo com os resultados observados por HAYASHI et al.

(2008), outra provável explicação em relação à presença de folículo dominante no final dos tratamentos hormonais, estaria relacionada à indução da ovulação dos folículos >9 mm de diâmetro no início dos protocolos hormonais, mecanismo que provavelmente favoreceu a formação de um corpo lúteo com diâmetro reduzido e diminuição das concentrações circulantes de progesterona (<1 ng/mL). Esse fenômeno permite a liberação de maiores pulsos de LH que levam a estimular o crescimento do folículo maior.

Outro mecanismo que pode explicar os resultados obtidos em relação à presença de folículo dominante, está relacionado ao tratamento com PGF_{2α} no momento da inserção dos implantes auriculares de norgestomet (D0). Sabe-se que a PGF_{2α} pode reduzir os níveis circulantes de progesterona, aumentando a frequência dos pulsos de LH, assim estimulando o crescimento do folículo dominante. CARVALHO (2004) observou em novilhas da raça Gir que o diâmetro do folículo dominante no dia da remoção do implante intravaginal de progesterona (D8) foi maior para o grupo com PGF_{2α} no dia 0 em relação a sem PGF_{2α} ($8,9 \pm 0,8$ vs $7,2 \pm 0,1$, respectivamente) e a taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia) foi de $1,0 \pm 0,2$ vs $0,6 \pm 0,2$, respectivamente. Já em novilhas Holandesas o diâmetro do folículo dominante com e sem PGF_{2α} foi de $10,5 \pm 0,8$ vs $6,7 \pm 1,0$ e a taxa de crescimento de $1,4 \pm 0,1$ vs $0,9 \pm 0,1$, respectivamente.

6.2 EFEITO DO TRATAMENTO HORMONAL E DO GRUPO GENÉTICO SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Não houve efeito da associação de implantes auriculares de norgestomet nos protocolos hormonais para o número de folículos visualizados, número de oócitos recuperados e taxa de recuperação em ambos os grupos genéticos (Tabela 4). Possivelmente a recuperação dos oócitos não apresentou variação entre os tratamentos do presente estudo, devido à presença de folículo dominante no momento da aspiração folicular. Sendo esta estrutura responsável por induzir atresia dos folículos em desenvolvimento através da secreção de inibina e estradiol.

PFEIFER et al. (2009a) em vacas *Bos taurus* x *Bos indicus*, apresentaram efeito no número de oócitos recuperados para os grupos progesterona baixa e alta em

relação sem progesterona ($6,6 \pm 0,8$, $7,0 \pm 0,8$ vs $3,4 \pm 0,7$, respectivamente), já para a taxa de recuperação o grupo progesterona alta foi superior quando comparado os grupos progesterona baixa e sem progesterona (68,8, 60,9 e 46,6%, respectivamente). SALES (2011) em doadoras da raça Gir e Holandesa suplementadas com dieta de alta energia e de manutenção, sincronizadas com um implante auricular de norgestomet novo mais benzoato de estradiol (D0). Obteve maior número de oócitos recuperados e taxa de recuperação nas vacas Gir ($22,8 \pm 1,5$ e 88,8%, respectivamente) quando comparado aos animais da raça Holandesa ($14,6 \pm 0,9$ e 60,4%, respectivamente).

Quanto ao número de oócitos recuperados no presente estudo (Tabela 4), esta variável não foi afetada em presença de corpo lúteo no dia da OPU para o tratamento controle da raça Gir e tratamentos controle e norgestomet baixo das Holandesas, como descrito anteriormente. Esses resultados são consistentes com os obtidos por BARBOSA (2011) que não apresentou diferença em vacas da raça Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet, benzoato de estradiol e $\text{PGF}_{2\alpha}$, em presença ou ausência de corpo lúteo no dia da OPU. Mas, a ausência de corpo lúteo no momento da aspiração folicular apresenta vários aspectos favoráveis, destacando-se a maior facilidade de localização e punção dos folículos, bem como a redução da perfusão vascular com menor captação de sangue (BACELAR et al., 2010). Porém, SENEDA et al. (2006) relataram que a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com este propósito é ainda questionável.

TAKUMA et al. (2010) concluíram que o número de folículos visualizados não foi afetado em ovários com presença ou ausência de corpo lúteo. No entanto, aumento da frequência das aspirações pode ter uma influência negativa na capacidade de produção de progesterona pelo corpo lúteo formado após os procedimentos de OPU.

Tabela 4. Efeito do tratamento hormonal associado a implantes auriculares de norgestomet, sobre a qualidade de oócitos de vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), Valença – RJ, 2012.

	VACAS GIR				VACAS HOLANDESAS			
	Controle	Norgestomet baixo	Norgestomet alto	Valor de P	Controle	Norgestomet baixo	Norgestomet alto	Valor de P
Nº de animais	2	2	2	-	2	2	2	-
Nº de OPUs	12	12	12		12	12	12	-
Nº folículos visualizados	20,4 ± 1,5	21,2 ± 1,3	21,6 ± 1,2	0,20	14,8 ± 1,2	16,0 ± 1,0	16,2 ± 0,9	0,49
Nº oócitos recuperados	10,0 ± 1,6	14,5 ± 2,7	13,7 ± 1,4	0,23	7,8 ± 1,3	8,5 ± 1,8	8,1 ± 0,7	0,42
Taxa de recuperação (%)	49,0 ± 7,0	68,3 ± 7,7	63,4 ± 6,6	0,22	52,7 ± 8,0	53,1 ± 8,1	50,0 ± 6,4	0,23
Nº oócitos grau I	1,1 ^b ± 0,5	4,0 ^a ± 0,6	2,4 ^b ± 0,8	0,05	1,8 ± 0,5	2,0 ± 0,6	1,5 ± 0,4	0,26
Nº oócitos grau II	3,1 ± 0,8	3,6 ± 0,8	3,4 ± 0,8	0,27	2,0 ± 0,5	1,5 ± 0,7	2,0 ± 0,4	0,40
Nº oócitos grau III	2,6 ± 0,7	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,7	0,22	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,3	0,49
Nº oócitos desnudos	1,8 ± 0,6	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,6	0,21	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,6	0,28
Nº oócitos expandidos	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,13	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,28
Nº oócitos degenerados	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,4	2,0 ± 0,9	0,26	0,8 ± 0,3	1,5 ± 0,6	0,8 ± 0,2	0,25
Nº oócitos viáveis	7,0 ± 1,3	10,9 ± 2,6	9,1 ± 1,4	0,21	5,9 ± 1,0	5,0 ± 1,8	5,0 ± 0,4	0,39
Taxa de oócitos viáveis (%)	70,0 ± 6,4	75,1 ± 4,7	66,4 ± 6,9	0,31	75,6 ± 5,7	58,8 ± 6,7	61,7 ± 5,6	0,31

Os dados estão descritos como média ± EPM.

^{a, b} Letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si, na variável do mesmo grupo genético, (P<0,05).

De acordo com a qualidade dos oócitos, os dados estão apresentados na Tabela 4. Foi observada diferença significativa ($P=0,05$) no número de oócitos grau I para o tratamento norgestomet baixo das vacas Gir em relação aos tratamentos controle e norgestomet alto ($4,0 \pm 0,6$ vs $1,1 \pm 0,5$ e $2,4 \pm 0,8$). Entretanto, nos animais da raça Holandesa não foi detectada a mesma influência. É possível que os baixos níveis de norgestomet liberados em decorrência à inserção de implantes auriculares previamente usados, influenciaram a qualidade dos oócitos através do sistema IGF. Sabe-se que baixas concentrações circulantes de progesterona têm efeito sobre a secreção hepática de IGF-1. Sendo este fator relacionado com qualidade oocitária em bovinos. Em relação às vacas Holandesas, provavelmente o maior metabolismo hepático dos hormônios esteroides associado a implantes auriculares com baixa concentração de norgestomet não influenciou o sistema IGF e a qualidade oocitária. Já foi descrito que zebuínos apresentam maior concentração plasmática de IGF-1 do que taurinos ($22,9 \pm 0,9$ vs $10,0 \pm 0,8$ ng/mL, respectivamente) (ALVAREZ et al., 2000), o que pode contribuir para a obtenção de oócitos de melhor qualidade (GRIMARD et al., 2012).

Devido ao fato de que no presente estudo o tratamento norgestomet baixo de ambos os grupos genéticos apresentou corpo lúteo no dia da OPU. É possível determinar que estes animais foram expostos aos efeitos de progesterona endógena e de norgestomet.

No entanto, estudo verificou que a administração de norgestomet entre o 5° ao 21° dia do ciclo estral, não afetou a secreção de progesterona endógena, nem a funcionalidade do corpo lúteo (revisado por KESLER, 1993). Em contraste com esses resultados, SANCHEZ et al. (1995) observaram que a aplicação de um, dois, quatro e oito implantes de norgestomet no 7° dia do ciclo estral diminuiu a concentração plasmática de progesterona, sendo verificado que após a remoção dos implantes houve aumento nos níveis circulantes de progesterona. Já na espécie bubalina, PANDEY et al. (2012) observaram que animais tratados com implantes auriculares de norgestomet pós-ovulação, a concentração plasmática de progesterona aumentou sem afetar a funcionalidade do corpo lúteo após a remoção dos implantes. Estudo *in vitro*, em concordância com os trabalhos relatados anteriormente, verificaram que a concentração de progesterona foi diminuída após 48 horas de cultivo de células luteais quando adicionado norgestomet ao meio (BOLDEN-TILLER, 2002).

PFEIFER et al. (2009a) concordando em parte com os resultados obtidos no presente estudo, obtiveram maiores porcentagens de oócitos grau I, II e III nos grupos sem progesterona e baixa progesterona quando comparado com alta progesterona (72,3 e 79,4 vs 68,4%, respectivamente). BORCHERT et al. (1999) em vacas mestiças *Bos taurus* sincronizadas com implantes de norgestomet, observaram maior porcentagem de oócitos com mais de três camadas de células do *cumulus*, em relação aos oócitos obtidos em ausência de norgestomet.

O número de oócitos viáveis e a taxa de oócitos viáveis não diferiram entre os tratamentos de cada grupo genético (Tabela 4). Segundo BARBOSA (2011), a taxa de oócitos viáveis não foi afetada em doadoras Nelore sincronizadas com implante de norgestomet em presença ou ausência de corpo lúteo no momento da OPU ($82,1 \pm 11,8$ vs $78,2 \pm 17,3$, respectivamente). Resultado diferente foi obtido por SALES (2011) em vacas Gir e Holandesas, sincronizadas com um implante novo de norgestomet. Os autores observaram maior número de oócitos viáveis e maior taxa de oócitos viáveis ($P=0,01$) nas vacas Gir ($19,3 \pm 1,2$ e 84,9%, respectivamente) em relação às Holandesas ($10,8 \pm 0,7$ e 74,1%, respectivamente).

Não foram identificadas diferenças entre os tratamentos hormonais das vacas Gir e das Holandesas para o número de estruturas clivadas e taxa de clivagem (Tabela 5). Porém, PFEIFER et al. (2009a) obtiveram maior taxa de clivagem dos grupos progesterona baixa e alta do que o grupo sem progesterona (67,5, 63,0 vs 50,0%, respectivamente).

Em relação ao número de blastocistos no dia sete (Tabela 5), verificou-se efeito significativo ($P=0,04$) na raça Gir do tratamento norgestomet baixo quando comparado aos tratamentos controle e norgestomet alto ($5,1 \pm 0,5$ vs $3,0 \pm 0,7$ e $2,1 \pm 0,6$, respectivamente). No entanto, na raça Holandesa não foi observada diferença entre os tratamentos. De acordo com os resultados apresentados anteriormente no número de oócitos grau I, provavelmente esse efeito favoreceu a produção de maior número de embriões no dia sete. Relatos de literatura determinaram que baixos níveis de norgestomet favoreceram a liberação de pulsos de LH, responsável por estimular a produção de estradiol (SANCHEZ et al., 1995), sendo o estradiol capaz de induzir a liberação de IGF-1, melhorando a qualidade oocitária e produção de embriões.

Tabela 5. Efeito do tratamento hormonal associado a implantes auriculares de norgestomet, sobre a recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), Valença – RJ, 2012.

	VACAS GIR				VACAS HOLANDESAS			
	Controle	Norgestomet baixo	Norgestomet alto	Valor de P	Controle	Norgestomet baixo	Norgetomet alto	Valor de P
Nº OPUs	12	12	12	-	12	12	12	-
Nº estruturas clivadas	5,6 ± 0,6	8,9 ± 1,2	7,8 ± 0,8	0,27	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,2	0,33
Taxa de clivagem (%)	80,0 ± 5,1	81,6 ± 5,1	85,7 ± 8,1	0,22	69,4 ± 5,8	68,0 ± 9,9	66,0 ± 7,9	0,47
Nº blastocistos no D7	3,0 ^b ± 0,7	5,1 ^a ± 0,5	2,7 ^b ± 0,6	0,04	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,6	1,6 ± 0,5	0,37
Taxa de blastocisto (%)	42,8 ± 7,4	46,7 ± 8,4	29,6 ± 8,2	0,26	27,1 ± 9,7	26,0 ± 10,2	32,0 ± 9,5	0,27

Os dados estão descritos como média ± EPM.

^{a,b} Letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si, na variável do mesmo grupo genético, (P<0,05).

Este mecanismo hormonal provavelmente foi determinante nos resultados observados das doadoras do grupo associado a um implante de norgestomet de segundo uso. Resultados similares foram apresentados por PFEIFER et al. (2009a), que obtiveram maior número de blastocistos para o grupo baixa progesterona ($1,3 \pm 0,4$) em relação aos grupos sem progesterona ($0,4 \pm 0,4$) e alta progesterona ($0,8 \pm 0,4$). Entretanto, BARBOSA (2011) não apresentou melhora na taxa de embriões viáveis para os animais com presença ou ausência de corpo lúteo tratados com implantes de norgestomet (36,1 vs 29,4%, respectivamente).

A Hipótese do presente estudo foi confirmada em parte nas vacas da raça Gir, uma vez que um implante auricular de norgestomet de segundo uso, associado aos protocolos de sincronização da onda folicular promoveu melhora no número de oócitos grau I e no número de blastocistos no dia sete. No entanto, os animais da raça Holandesa não foram afetados no desempenho da produção de embriões *in vitro* através da associação de implantes auriculares de norgestomet.

Tabela 6. Efeito do grupo genético sobre a produção *in vitro* de embriões, Valença – RJ, 2012.

	VACAS GIR	VACAS HOLANDESAS	Valor de P
Nº OPUs	36	36	-
Nº folículos visualizados	21,1 ^a ± 0,7	15,7 ^b ± 0,6	0,0002
Nº oócitos recuperados	12,7 ^a ± 1,1	8,2 ^b ± 0,7	0,0013
Taxa de recuperação (%)	60,1 ± 5,0	52,2 ± 4,4	0,28
Nº oócitos grau I	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,2	0,31
Nº oócitos grau II	3,4 ^a ± 0,4	1,8 ^b ± 0,3	0,0057
Nº oócitos grau III	3,1 ^a ± 0,4	1,6 ^b ± 0,3	0,0067
Nº oócitos viáveis	9,0 ^a ± 1,0	5,5 ^b ± 0,7	0,01
Taxa de oócitos viáveis (%)	70,8 ± 3,6	67,0 ± 3,7	0,86
Taxa de clivagem (%)	81,8 ^a ± 3,5	68,7 ^b ± 4,5	0,02
Nº blastocistos no D7	3,3 ^a ± 0,5	1,5 ^b ± 0,4	0,03
Taxa de blastocisto (%)	36,6 ± 4,7	27,2 ± 5,5	0,28

Os dados estão descritos como média ± EPM.

^{a, b} Letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si, (P<0,05).

Conforme mostrado na Tabela 6, houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas variáveis número de folículos visualizados ($P = 0,0002$), número de oócitos recuperados ($P = 0,0013$), número de oócitos grau II (0,0057) e III (0,0067), número de oócitos viáveis ($P = 0,01$), taxa de clivagem (0,02) e número de blastocistos no dia sete (0,03).

Maior número de folículos visualizados tem sido relatado em *Bos indicus* quando comparado com *Bos taurus* (ALVAREZ et al. 2000; CARVALHO et al., 2008; GIMENES, 2010; PONTES et al., 2010; SALES, 2011). De igual forma foi descrito que maior número de oócitos recuperados é reflexo de maior população folicular em *Bos indicus* do que *Bos taurus* (CAMARGO et al., 2007; GIMENES, 2010; PONTES et al., 2010; SALES, 2011; BASTOS, 2012; EVANS et al., 2012).

Entretanto, maior número de oócitos de boa qualidade em raças zebuínas quando comparado com fêmeas taurinas foi relacionado a maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 e insulina (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000; HAYASHI et al., 2008; SATRAPA, 2011; SALES, 2011; GRIMARD et al., 2012).

Quanto ao maior número de oócitos viáveis que foi observado na raça Gir ($9,0 \pm 0,1$) em relação às Holandesas ($5,5 \pm 0,7$) pode ser em decorrência a um maior número de folículos visíveis, maior número de oócitos recuperados e melhor qualidade das estruturas colhidas.

Em relação às taxas de clivagem foi observado superioridade das vacas Gir ($81,8\% \pm 3,5$) quando comparado às Holandesas ($68,7\% \pm 4,5$). Esta diferença provavelmente seja atribuída ao efeito dos implantes de norgestomet, principalmente no grupo que associou um implante auricular de segundo uso em vacas Gir. As taxas de clivagem observadas na raça Gir do presente estudo foram similares às obtidas por SALES (2011), que utilizou implantes novos de norgestomet para a sincronização da onda folicular (73,6%). Mas, as vacas Holandesas do presente trabalho apresentaram maiores taxas de clivagem às obtidas por GIMENES (2010) ($59,9\% \pm 3,6$), que associou implantes auriculares de norgestomet antes da OPU. RIZOS et al. (2005) mostraram que a qualidade dos oócitos é um fator determinante no mecanismo de clivagem e produção de embriões até o estágio de blastocisto.

Relativo ao número de blastocisto, as doadoras Gir foram superiores às vacas Holandesas ($3,3 \pm 0,5$ vs $1,5 \pm 0,4$). O resultado satisfatório obtido na taxa de clivagem do atual estudo provavelmente influenciou a produção de maior número de embriões nesta raça. Apesar de que as raças *Bos indicus* apresentam melhor

desempenho na produção de embriões *in vitro* em relação aos animais *Bos taurus*. É possível considerar que o norgestomet contribuiu para a apresentação de maior número de blastocistos no dia sete em reflexo a melhor qualidade dos oócitos e maior taxa de clivagem. CAMARGO et al. (2007) verificaram que vacas da raça Gir apresentam melhor desempenho na produção de blastocistos ($P < 0,05$), em relação a vacas Holandesas (19,6 vs 10,8%, respectivamente). Já ESCALONA et al. (2008); GIMENES (2010) e SALES (2011) confirmaram a superioridade das raças *Bos indicus* na produção *in vitro* de embriões em relação aos animais de raças *Bos taurus*. No entanto, ESCALONA et al. (2008) relataram que o menor desempenho das raças *Bos taurus* em relação às *Bos indicus*, pode ser atribuído a menores taxas de fertilização e menor capacidade de desenvolvimento após a fecundação.

6.3 INTERAÇÃO ENTRE GRUPO GENÉTICO E SESSÃO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Houve interação entre o grupo genético x sessão de aspiração folicular nas variáveis número de folículos visualizados, número de oócitos grau I, taxa de clivagem e taxa de blastocisto (Figuras 6 a 9).

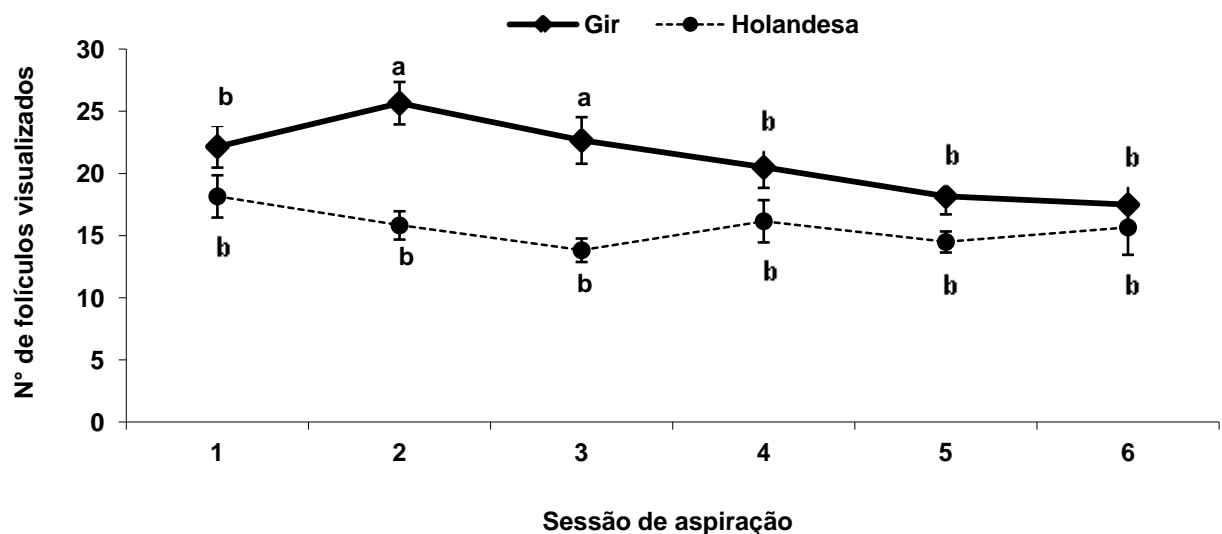


Figura 6. Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para número de folículos visualizados, Valença – RJ, 2012.

Quanto ao número de folículos visualizados, as vacas Holandesas se mantiveram estáveis ao longo das sessões de OPU, sendo observado na segunda e terceira sessão, superioridade das Gir em relação às vacas Holandesas. Apesar de que nas doadoras Gir observou-se uma redução numérica no número de folículos visualizados entre a primeira ($22,1 \pm 1,6$) e a última ($17,5 \pm 1,7$) punção folicular, não houve diferença significativa da sessão de aspiração através do tempo (Figura 6). De modo diferente, SALES (2011) não detectou efeito no número de folículos visualizados entre doadoras Gir e Holandesas ao longo de nove sessões de OPU consecutivas.

GIMENES (2010) observou superioridade de novilhas Nelore em relação a novilhas Holandesas submetidas a seis sessões de OPU, sendo verificado na última sessão de aspiração diminuição dos folículos visualizados das Nelore, igualando-se às Holandesas. Estes resultados coincidem em parte com os obtidos por TORRES-JÚNIOR et al. (2008), que apresentaram diminuição no número de folículos visualizados em vacas da raça Gir submetidas a 24 sessões de OPU com intervalos de 7 dias.

Segundo VIANA et al. (2003), a diminuição no número de folículos visualizados nas vacas Gir, pode estar relacionado a fatores mecânicos, associados a intensidade dos procedimentos de OPU, ocasionando lesões nos ovários e sendo proporcional ao número de punções realizadas e ao número de folículos observados, desenvolvendo-se alterações tais como, formação de uma rede fibrosa e aderências.

Os achados do presente estudo indicam que animais submetidos a OPU's consecutivas com intervalos menores de 14 dias, podem alterar a reconstituição dos folículos antriais da onda folicular subsequente.

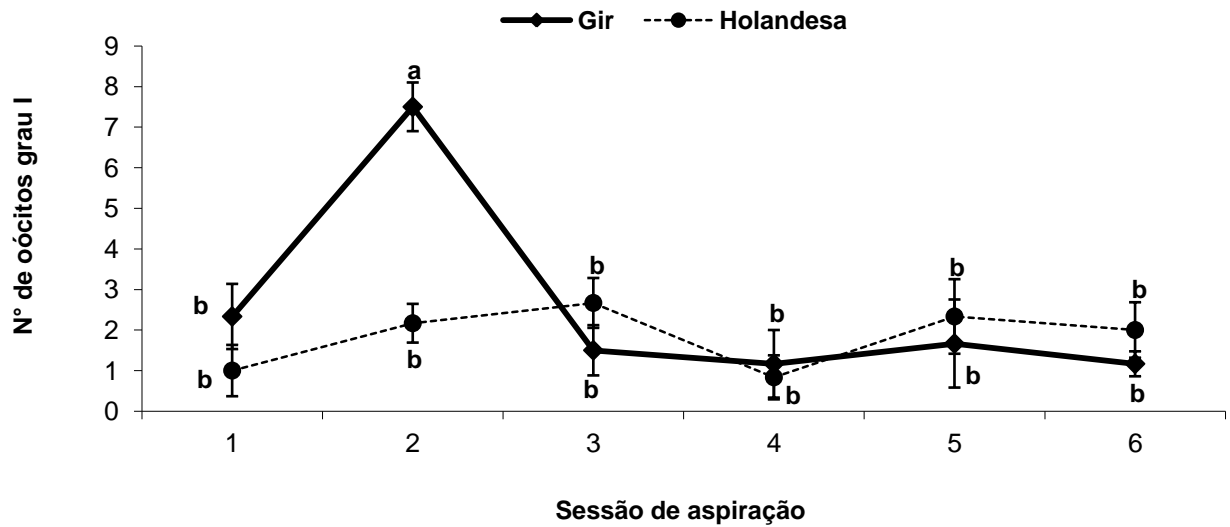


Figura 7. Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para o número de oócitos grau I, Valença – RJ, 2012.

Em relação ao número de oócitos grau I, foi detectado efeito na segunda sessão de aspiração para as vacas Gir quando comparado às Holandesas. Já nas outras sessões de OPU não houve efeito de raça em relação ao número de oócitos grau I. Estes achados discordam dos apresentados por SALES (2011), que obteve melhor qualidade oocitária em vacas da raça Gir do que Holandesas ao longo de nove sessões de aspiração folicular.

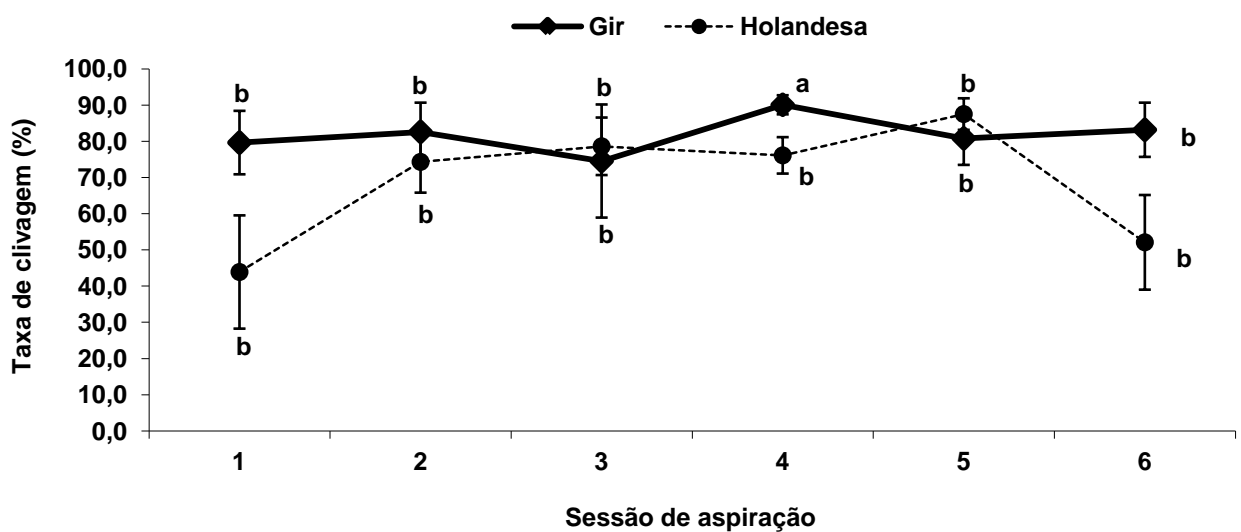


Figura 8. Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para taxa de clivagem (%), Valença – RJ, 2012.

Quanto à taxa de clivagem, foi observado na quarta sessão de OPU superioridade das vacas Gir em relação às Holandesas (Figura 8). De maneira geral, os resultados obtidos nas Gir do atual estudo, estão dentro dos valores encontrados por outros autores nos animais da mesma raça (entre 59,1 a 82,9%; VIANA et al., 2004; CAMARGO et al., 2007; TORRES-JÚNIOR et al., 2008). Já nas Holandesas, a primeira e última sessão de OPU, apresentou valores inferiores aos reportados pela literatura (entre 70,9 a 79,2%; BOUSQUET et al., 1999; GALLI et al., 2003; TAMASSIA et al., 2003). Estes resultados provavelmente estão associados à qualidade inferior dos oócitos, diminuindo a competência para o desenvolvimento *in vitro* das estruturas.

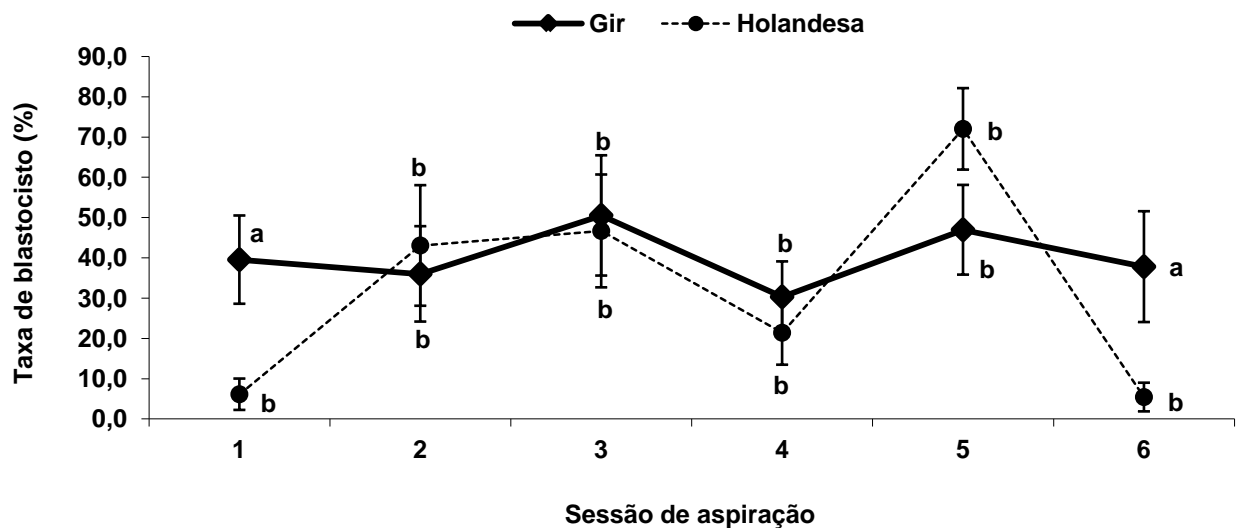


Figura 9. Efeito da interação entre grupo genético (Gir vs Holandesa) e sessão de aspiração folicular, para taxa de blastocisto (%), Valença – RJ, 2012.

De acordo com a taxa de blastocisto, houve interação na primeira e última sessão de aspiração folicular das fêmeas Gir, quando comparado às vacas Holandesas (Figura 9). Segundo os relatos de literatura, estas variações podem ser em decorrência da qualidade dos oócitos obtidos, da qualidade do sêmen utilizado ou do tipo de meio de cultura empregado (HANSEN, 2006; ARRUDA et al., 2012). No entanto, a diminuição observada na taxa de blastocisto das vacas Holandesas, provavelmente tenha sido em consequência a obtenção de oócitos de menor qualidade devido a períodos de elevação de temperatura que foram registrados durante o tempo experimental. Assim, reduzindo a capacidade de desenvolvimento

após fecundação, afetando subsequentemente, a taxa de clivagem e taxa de blastocisto, isto porque não houve alterações de qualidade do sêmen e meio de cultura em relação às demais sessões de OPU. Segundo ESCALONA et al. (2008), oócitos de *Bos taurus* apresentam menor resistência ao estresse térmico do que oócitos oriundos de raças *Bos indicus*. Entretanto, CAMARGO et al. (2007); ESCALONA et al. (2008); GIMENES (2010); PONTES et al. (2010) e SALES (2011) verificaram que fêmeas *Bos indicus* apresentam melhor desempenho na produção *in vitro* de embriões do que fêmeas *Bos taurus*.

7. CONCLUSÕES

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

A aplicação de um implante auricular de norgestomet de segundo uso em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) melhora o número de oócitos grau I e o número de blastocistos no dia sete, confirmando em parte a hipótese do presente estudo;

A inserção de um implante auricular de norgestomet usado ou dois implantes novos em vacas Holandesas (*Bos taurus*) não melhora a qualidade oocitária e a produção de embriões *in vitro*.

8. IMPLICAÇÕES

Apesar de haver influência da aplicação de um implante auricular de norgestomet previamente utilizado na raça Gir sobre a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões. É necessário a realização de mais estudos em vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*, para determinar o número adequado de implantes inseridos e o efeito de norgestomet sobre as concentrações circulantes de hormônios esteroides e hormônios metabólicos, que têm conhecida influência na qualidade oocitária. O conhecimento destes mecanismos, principalmente em raças taurinas, pode trazer novas perspectivas na utilização destes animais em programas de OPU-PIV.

9. REFERÊNCIAS

- ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; PISSET, C.; REMY, J.J.; SALESSE, R.; MONNIAUX, D. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biology of Reproduction*, v.60, p.845-854, 1999.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicles-stimulating hormone and emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod Fert*, v.94, p.177-188, 1992.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.14, p.411-420, 1980.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod. Dom. Anim*, v.45, p.180-187, 2010.
- AKISON, L.K.; ROBKER, R.L. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.288-296, 2012.
- ALMEIDA, A.B. Reutilização de implantes de norgestomet em vacas da raça Nelore. 2003. 77 f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci*, v.78, p.1291- 1302, 2000.
- APARICIO, I.M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L.C.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod*, v.84, p.910-921, 2011.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, A.F.; AFFONSO, F.J. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. *Anim. Reprod*, v.9, n.3, p.345-353, 2012.
- BACELAR, D.; MAX, M.C.; PADILHA, L.; BARREIROS, T.R.; SENEDA, M.M. Incremento na obtenção de óocitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas

com progesterona injetável e benzoato de estradiol. *Ciências Agrárias*, v.31, p.163-172, 2010.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.F. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1158-1168, 1997.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1903-1921, 1998.

BARBOSA, C.P. Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. 2011. 66 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, 2011.

BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.19, p.9-12, 1995.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.205-211, 2007.

BASTOS, M.R. Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. 2012. 156 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-41, 2001.

BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v.132, p.365-377, 2006.

BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal responses to experimental suppression of FSH during follicular deviation in cattle. *Theriogenology*, v.54, p.1191-1206, 2000.

BINELLI, M.; MURPHY, B.C. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod. Fert. Dev*, v.22, p.1-12, 2010.

BISINOTTO, R.S.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci*, v.93, p.3578-3587, 2010.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.-A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.54-62, 1995.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.-A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, v.46, p.1191-1203, 1996.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.-A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, v.47, p.1061-1075, 1997a.

BLONDIN, P.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.-A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, v.48, p.803-813, 1997b.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M., MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, v.41, p.1555-1569, 1994.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci*, v.39, p.193-204, 1995.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinámica Folicular Ovária en el Bovino. In: Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, 2000, São Paulo: Departamento de reprodução animal: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Anais, p. 12-34, 2000.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.

BOLDEN-TILLER, O.U. Characterization of progesterone receptor in bovine corpora lutea. 2002, 198 f. These (Doctor), University of Missouri, Columbia, United States of American, 2002.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v.43, p.677-787, 1995.

BOLS, P.E.J.; LEIN, A.; YSEBAERT M.T.; VAN SOOM, A.; de KRUIF, A. Effects of a long term treatment with bovine somatotropin on oocyte and blastocyst yield after OPU/IVF. *Theriogenology*, v.47, p.315, 1997.

BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, v.62, p.906-914, 2004.

BONDENSTEINER, K.L. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.1115-1128, 1996.

BORCHERT, K.M.; FARIN, C.E.; WASHBURN, S.P. Effect of estrus synchronization with norgestomet on the integrity of oocytes from persistent follicles in beef cattle. *J. Anim. Reprod.*, v.77, p.2742-27448, 1999.

BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L.C. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology*, v.48, p.291-298, 1997.

BORGES, A.M. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. *R. Bras. Zootec.*, v.32, p.276-283, 2003.

BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepurbetal calves. *Theriogenology*, v.45, p.1163-1176, 1996.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, A.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v.43, p.667-675, 1995.

BURATINI, J.J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.190-196, 2007.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, v.27, p.217, 1987.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R. developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocyte obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v.68, p.626-632, 2007.

CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, *Bos taurus*. 2004. 122p. Tese Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo / SP, 2004.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H. BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, n.2, p.167-175, 2008.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, v.98, p.189-196, 2006.

CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte

and embryo production in an OPU–IVP system. *Theriogenology*, v.67, p.719-728, 2007.

CHAUHAN, M.S.; NADIR, S.; BAILEY, T.L.; PRYOR, A.W.; BUTLER, S.P.; NOTTER, D.R.; VELANDER, W.H.; GWAZDAUSKAS, F.C. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *J. Dairy Sci*, v.82, p.918-926, 1999.

COHEN, J.; DEBACHE, C.; PAEZ, J.P.; JUNCA, A.M.; COHEN-BACRIE, P. Transvaginal sonographically controlled ovarian puncture for oocyte retrieval for *in vitro* fertilization. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, v.3, n.5, p.309-313, 1986.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, A.H.A. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: III capacidade de desenvolvimento após fecundação *in vitro*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.49, n.5, p.575-581, 1997.

DAYAN, A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. 2001. 56p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu / SP, 2001.

DE ARMAS, R.; SOLANO, R.; PUPO, C.A.; AGUILAR, A.; AGUIRRE, A.; RIEGO, E.; CASTRO, F.O. Effect of the donor oocyte breed on *in vitro* fertilization results in cattle. *Theriogenology*, v.41, p.186, 1994.

DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, Ch. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reprod Dom Anim*, v.43, p.239-245, 2008.

DELLENBACH, P.; NISAND, I.; MOREAU, L.; FERGER, B.; PLUMERE, C.; GERLINGER, P.; BRUN, .; RUMPER, Y. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *The Lancet*, v.323, n.8392, p.1467, 1984.

DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; POORTMAN, J.; van TOL, H.T. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J Reprod Fertil*, v.69, p.641-649, 1983.

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci*, v.78, p.345-370, 2003.

EL-SHERRY, T.M.; MATSUI, M.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A.; MEGAHED, G.A.; SHEHATA, S.H.; MIYAKE, Y.-I. Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology*, v.73, p.488-495, 2010.

ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fert*, v.10, p.97-105, 1966a.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci, v.25, p.800-805, 1966b.

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

EVANS, A..C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. Reprod. Dom. Anim, v.47, p.31-37, 2012.

FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER WAAG, D.F.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. Theriogenology, v.59, p.125-138, 2003.

FAIR, T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. Anim. Reprod. Sci, v.22, p.13-20, 2010.

FAIR, T.; LONERGAN, P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. Reprod Dom Anim, v.47, p.142-147, 2012.

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

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

FONSECA, F.A.; BRITT, J.H.; McDANIEL, B.T.; WILK, J.C.; RAKES, A.H. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. J Dairy Sci, v.66, p.1128-1147, 1983.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. Anim. Sci, Reprod, 2010.

FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; QUIRK, S.M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. Theriogenology, v.29, p.95-109, 1988.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim. Reprod. Sci, v.78, p.135-163, 2003.

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

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies, *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C.; BARROS, C.M. Dinâmica folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 22, p. 201-210, 1999.

GARCÍA, F.E.O.; CORDERO, M.J.L.; HIZARZA, E.A.; PERALTA, O.J.G.; ORTEGA, C.M.E.; CÁRDENAS, M.; GUTIERREZ, C.G.; SÁNCHEZ, T.E.M.T. Induction of a new follicular wave in holstein heifers synchronized with norgestomet. *Anim. Reprod. Sci.*, v.80, p.47-57, 2004.

GIMENES, L.U. Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*). 2006. 113p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIMENES, L.U. Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos, e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. 2010. 122p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, v.8, p.223-230. 1989.

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

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

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*, v.50, p.507-519, 1998.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology*, v.52, p.1079-1093, 1999.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.*, v.63, p.383-389, 2000.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, v.64, p.197-205, 2001.

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

GIOMETTI, I.C.; CASTILHO, A.C.S.; SÁ FILHO, O.G.; PAPA, P.C.; BURATINI, J.J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.34-52, 2009.

GLISTER, C.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. Bovine follicle development is associated with divergent in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology*, v.188, p.215-225, 2006.

GOFF, A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol Reprod*, v.71, p.11-16, 2004.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; GUTIÉRREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.105, p.263-270, 1995.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIÉRREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology of Reproduction*, v.55, p.68-74, 1996.

GONG, J.G.; LEE, W.J.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, v.123, p.419-427, 2002.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1999.

GOODHAND, K.L.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Animal Reproduction Science*, v.63, p.145-158, 2000.

GRIMARD, B.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; REMY, D.; RICHARD, C.; NUTTINCK, F.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A.A. Postpartum variations of plasma IGF and IGFBPs, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. *Reprod Dom Anim*, 2012.

HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. *Theriogenology*, v.65, p.119-125, 2006.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*, v.51, p.757-765, 1999.

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

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

HASSAN, H.A.; ENRIGHT, W.J.; TUCKER, H.A.; MERKEL, R.A. Estrogen and androgen elicit growth hormone release via dissimilar patterns of hypothalamic neuropeptide secretion. *Steroids*, v.66, p.71-80, 2001.

HAYASHI, K-G.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; SUDO, N.; SATO, A.; SHIRASUNA, K.; TETSUKA, M.; KIDA, K.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. The absence of corpus luteum formation alters the endocrine profile and affects follicular development during the first follicular wave in cattle. *Reproduction*, v.136, p.787-797, 2008.

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

HILL, G.M.; LUCAS, D.M.; RICHARDSON, K.L.; BAKER, J.F.; KISER, T.E. Ovarian luteal activity and reproductive performance of heifers with norgestomet prototype implants. *Theriogenology*, v.37, p.619-629, 1992.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v.124, p.43-101, 1991.

HODGEN, G. D. The dominant ovarian follicle. *Fertil. Steril.*, v. 38, p. 281, 1982.

INSKEEP E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci*, v.82, E24–E39, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. PPM 2011: rebanho bovino cresce 1,6% e chega a 212,8 milhões de cabeças. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1. Acesso: 4 de março de 2013.

IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci*, v. 83, p.1648-1658, 2000.

JIMÉNEZ, F.; GALINA, C.S.; DUCHATEAU, A.; NAVARRO-FIERRO, R. Levels of LH, progesterone and estradiol-17 β during natural and PGF2 α -induced estrus in Indobrazil and Brown Swiss cows in the tropics. *Anim. Reprod. Sci*, v.16, p.199-206, 1988.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; HOU, X.; DAVIS, J.S.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol Reprod*, v.80, p.1272-1281, 2009.

KASTELIC, J.P.U. Understanding ovarian follicular development in cattle. *Food-Animal Practice*, p.64-71, 1994.

KESLER, D.J. Remotely delivered contraception with needleless norgestomet implants. *Contraception in Wildlife Management, Proceedings of a Symposium*, Denver, Colorado, p.171-184, 1993.

KESLER, D.J.; FAVERO, R.J.; TROXEL, T.R. A Comparison of Hydron and Silicone Implants in the Bovine Norgestomet and Estradiol Valerate Estrus Synchronization Procedure. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.21, p.475-485, 1995.

KESLER, D.J. Norgestomet implants maintain pregnancy in ovariectomized heifers. *Theriogenology*, v.48, p.89-98, 1997a.

KESLER, D.J.; DYSON, T.S.; SUMMERS, R.N.; STECKLER, T.L.; NASH, T.G. Effect prostaglandin $F_{2\alpha}$ treatment before norgestomet and estradiol valerate treatment on regression, formation, and function of corpora lutea in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci*, v.47, p.281-289, 1997b.

KIMMINS, S.; MACLAREN, L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, v.22, p.742-748, 2001.

KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. Progesterin and endrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci*, v.74, p.1424-1440, 1996.

KOTWICA, J.; MISZKIEL, G.; SKARZYNSKI, D.; BOGACKI, M. Effect of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, v.58, p.338, 1998.

KRININGER III, C.E.; BLOCK, J.; AL-KATANANI, Y.M.; RIVERA, R.M.; CHASE Jr, C.C.; HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.13-24, 2003.

KRUIP, Th.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v.42, n,2, p.675-684, 1994.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v.52, p.913-921, 1999.

LARSON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*, v.38, p.255-267, 1992.

LEAL, C.L.V.; ADONA, P.R. O bloqueio meiótico e a maturação *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.131-144, 2006.

LENZ, S.; LEETON, J.; RENOU, P. Transvaginal recovery of oocytes for *in vitro* fertilization using vaginal ultrasound. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, v.4, n.1, p.51-55, 1987.

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

LONERGAN, P; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.

LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci*, v.81, p.209-223, 2004.

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci*, v.83, p.1635-1647, 2000.

MACHADO, R.; KESLER, D.J. Efficacy of norethindrone acetate and norgestomet implants in suppressing estrus in female beef cattle. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.22, p.1211-1216, 1996.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.45, n.3, p.801-810, 1996.

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

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.307-320, 1996.

MALUF, D.Z.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; MOREIRA, R.J.C.; MADUREIRA, E.H.; GONÇALVES, J.R.; LIMA, L.G.; MENDES, C.Q.; BIEHL, M.V. Avaliação da reutilização de implantes contendo progestágenos na taxa de prenhez em vacas de corte. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, v.47, n.1, p.38-46, 2010.

McGUIRE, W.J.; LARSON, R.L.; KIRACOFÉ, G.H. Syncro-mate B[®] induces estrus in ovariectomized cows and heifers. *Theriogenology*, v.34, p.33-37, 1990.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in

commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-674, 2003.

MIHM, M.; CROWE, M.A.; KNIGHT, P.G.; AUSTIN, E.J. Follicle wave growth in cattle. *Reprod. Domest. Anim*, v.37, p.191-200, 2002.

MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.217-237, 2003.

MOFFATT, R.J.; ZOLLERS, W.G.; WELSHONS, W.V.; KIEBORZ, K.R.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F. Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. *Domestic animal endocrinology*, v.10, p.21-30, 1993.

MONTEIRO, F.M.; FERREIRA, M.M.G.; POTIENS, J.R.; EBERHARDT, B.G, TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. *Reprod. Dom. Anim*, v.45, p.860-864, 2010.

MURPHY, B.D. Research in animal reproduction: Quo vadimus?. *Anim. Reprod*, v.9, p.217-222, 2012.

OLIVEIRA, J.F.; NEVES, J.P.; MORAES, J.C.; GONCALVES, P.B.; BAHR, J.M.; HERNANDEZ, A.G.; COSTA LF. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Anim. Reprod. Sci*, v.73, p.1-10, 2002.

OSBORN, J.C.; MOOR, R.M. The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J Steroid Biochemistry*, v.19, p.133-137, 1983.

PANDEY, A.K.; DHALIWAL, G.S.; GHUMAN, S.S.; SINGH, J.; KUMAR, A.; AGARWAL, S.K. Impact of norgestomet supplementation during early luteal phase on subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo: a preliminary study. *Tropical Animal Health and Production*, v.45, p.293-298, 2012.

PATEL, O.V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J.J.; COUSSENS, P.M.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, v.133, p.95-106, 2007.

PELUSO, J.J.; PAPPALARDO, A. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesteronebinding protein with gamma aminobutyric acid A receptor-like features. *Biol Reprod*, v.58, p.1131-1137, 1998.

PERRY, G.A.; WELSHONS, W.V.; BOTT, R.C.; SMITH, M.F. Basis of melengestrol acetate action as a progestin. *Dom. Anim. Endocrinology*, v.28, p.147-161, 2005.

PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A.-S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy

heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, v.60, p.175-188, 2003.

PFEIFER, L.F.M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G.P.; XAVIER, E.G.; DIONELLO, N.J.L.; CORRÊA, M.N. Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Reprod*, v.6, p.473-480, 2009a.

PFEIFER, L.F.M.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A.; ADAMS, G.P.; DIONELLO, N.J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology*, v.72, p.1237-1250, 2009b.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, v.29, p.21-37, 1988.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v.30, p.751-762, 1988.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, Th.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, H.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.35, n4, p.857-862, 1991.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.

PIVATO, I.; PEREIRA, D.C.; PEIXER, M.A.S. Efeito do bst sobre a taxa de recuperação e qualidade dos oócitos bovinos. *Arquivos da Faculdade Veterinária UFRGS*, v.27, p.171-186, 1999.

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

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. *Theriogenology*, v.74, p.1349-1355, 2010.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 2011.

RATHBONE, M.J.; KINDER, J.E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C.R.; BUNT, C.R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.50, p.277-320, 2001.

REICHENBACH, H.D.; WIEBKE, N.H.; MÖDL, J.; ZHU, J.; BREM, G. Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.101, p.547, 1994.

REIS, A.; STAINES, M.E.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; McEVOY, T.G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.72, p.137-151, 2002.

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

SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; AYRES, H.; CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de Norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progesterona. *Acta Sci Vet*, v.33, p.266, 2005.

SALHAB, M.; TOSCA, L.; CABAU, C.; PAPIILLIER, P.; PERREAU, C.; DUPONT, J.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology*, v.75, p.90-104, 2011.

SALES, J.N.S. efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. 2011. 161 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.185-194, 2010.

SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M.E.; KOJIMA, F.M.; CUPP, A.S.; BERGFELD, E.G.; PETERS, K.E.; MARISCAL, V.; KITOK, R.J.; KINDER, J.E. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 β -estradiol in heifers. *Biol. Reprod.*, v.52, p.464-469, 1995.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.42, p.53-64, 2002.

SANTIAGO, L.L. Perfil hormonal de progesterona durante o ciclo estral em novilhas Nelore confinadas com diferentes ondas de crescimento folicular. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, p.2017-2020, 2001.

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

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci*, v.87. p.905-920, 2004.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; MOLLO, M.R.; MARTINS, A.C.; Influência da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.869-873, 2007.

SATRAPA, R.A. Influência dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A na aquisição de tolerância ao estresse térmico de embriões bovinos (Nelore vs Holandês) produzidos *in vitro*. 2011. 94 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.

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

SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; MORRIS, G.R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M.R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fert*, v.98, p.77-84, 1993.

SCOTT, C.A.; ROBERTSON, L.; DE MOURA, R.T.D.; PATERSON, C.; BOYD, J.S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet Rec*, v.134, p.440-443, 1994.

SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K.-G.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, v.106, p.208-214, 2008.

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

SENEDA, M.M.; SANTOS, G.M. G.; SILVA, K.C.F.; SPEGIORIN, M.R.; BLASCHI, W.; PONTES, J.H.F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, Londrina. *Anais...* Londrina, p.172-180, 2006.

SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, D. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.143-152, 2008.

SILVA, C.C.; KNIGHT, P.G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *J Reprod Fert*, v.119, p.261-269, 2000.

SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R.; van den HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, v.71, p.1193-1208, 2009.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v.76, p.1051-1057, 2011.

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

SIRARD, M.-A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, v.51, p.699-708, 1999.

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

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, v.123, p.185-202, 2002.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Temporal and special alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*, v.53, p.1527-1543, 1995.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod*, v.71, p.2-10, 2004.

SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.*, v.71, p.1232-1241, 1993.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 4ª edição. Brasil, 2010.

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. Anim. Reprod, v.9, p.210-216, 2012.

TAKUMA, T.; OTSUBO, T.; KUROKAWA, Y.; ICHIMARU, H.; OTOI, T. Effects of twice-weekly follicular punctures of ovaries with or without the corpus luteum on follicular and luteal dynamics. Reprod. Dom. Anim, v.45, p.50-54, 2010.

TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, J.P.; CHASTANT-MAILLARD, S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. Reproduction, v.126, p.629-637, 2003.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R.; WALTON, J.S. Ovarian follicular dynamics and plasma luteinizing hormone concentrations in norgestomet-treated heifers. Anim. Reprod. Sci, v.32, p.173-184, 1993.

TECHAKUMPHU, M.; PROMDIREG, A.; NACHIENGMAI, A.; PHUTIKANIT, N. Repeated oocyte pick-up in prepuberal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. Theriogenology, v.61, p.1705-1711, 2004.

TORRES-JÚNIOR, J.R de S.; PIRES, M. de F.A.; de SÁ, W.F.; FERREIRA, A. de M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; de FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; de SÁ FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. Theriogenology, v.69, p.155-166, 2008.

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

van WAGTENDONK-de LEEUW, A.M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. Theriogenology, v.65, p.914-925, 2006.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. Theriogenology, v.60, p.923-932, 2003.

VIANA, J.H.M.; NASCIMENTO, A.A.; PINHEIRO, N.L.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; MARQUES JUNIOR, A.P. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. Pesq. Vet. Bras, v.23, p.119-124, 2003.

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

VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P.; SIQUIERA, L.G.B.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed

(*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v.73, p.966-972, 2010.

VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O embrião*, Edição 51, p.6-10, 2012.

VISHWANATH, R. artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, v.65, p.17-29, 2006,

WILTBANK, M.C.; SOUZA, A.H.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W.; NASCIMENTO, A.B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.24, p.238-243, 2011.

WILTBANK, M.C.; SOUZA, A.H.; GIORDANO, J.O.; NASCIMENTO, A.B.; VASCONCELOS, J.M.; PEREIRA, M.H.C.; FRICKE, P.M.; SURJUS, R.S.; ZINSLY, F.C.S.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W.; SARTORI, R. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod*, v.9, p.231-241, 2012.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; SÁVIO, J.D.; MEIDAN, R.; LEW, B.J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod*, v.52, p.1106-1113, 1995.

XIAO, C.; LIU, W.J.; SIROIS, J.; GOFF, A.K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in bovine epithelial cells. *Endocrinology*, v.139, p.2293-2299, 1998.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, v.53, p.951-957, 1995.