

BÁRBARA LETÍCIA MARCHI DA SILVA

**EFICIÊNCIA DE VACAS GIROLANDO TRATADAS COM FSH
NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS, PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES E TAXA DE PREENHEZ**

BÁRBARA LETÍCIA MARCHI DA SILVA

**EFICIÊNCIA DE VACAS GIROLANDO TRATADAS COM FSH
NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS, PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES E TAXA DE PREENHEZ**

Dissertação apresentada à UNOPAR, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. PAULO ROBERTO ADONA.

BÁRBARA LETÍCIA MARCHI DA SILVA

**EFICIÊNCIA DE VACAS GIROLANDO TRATADAS COM FSH
NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS, PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES E TAXA DE PREENHEZ**

Dissertação apresentada à UNOPAR, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Saúde e Produção de Ruminantes.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador Dr. PAULO ROBERTO ADONA
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. CELSO KOETZ JUNIOR
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. RAFAEL FAGNANI
Universidade Norte do Paraná

Arapongas, 22 de março de 2018.

Dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais, pela dedicação e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Adona, meu orientador, por estar sempre disposto a me ajudar.

A minha família, em especial meus pais, Maria e Laercio, pelo incentivo e colaboração, em todos os momentos de dificuldade, os quais não foram poucos.

Ao corpo de docência do mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes da UNOPAR. Em especial ao Prof. Dr. Werner Okano, que me ajudou e aconselhou nessa caminhada.

À Mayara, companheira que contribuiu em todos os momentos desde a companhia diária, a elaboração projeto.

Ao colega de laboratório Samuel, por estar sempre disposto a colaborar com o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos e familiares que sempre me ajudaram e me incentivaram, em todos os momentos. Em Especial, Renata, Rosane, Nazelia e Tide (tios), Vanessa, Alessandro, Junior e Bianca (primos). Os quais sempre me estenderam as mãos quando precisei.

A Agropecuária Laffranchi e a Universidade Norte do Paraná por concederem à infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

Muito obrigada!

MARCHI, Bárbara Leticia. EFICIÊNCIA DE VACAS GIROLANDO TRATADAS COM FSH NA RECUPERAÇÃO DO OÓCITOS, PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXA DE PRENHE. 2017. Dissertação de Mestrado Acadêmico Saúde e produção de Ruminantes (Mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2017.

RESUMO

No presente estudo comparou-se doadoras Girolando tratadas com FSH em dose única e aspiração folicular 24 horas após a aplicação do hormônio e seus efeitos na taxa de recuperação de oócitos, produção de embriões *in vitro*, reidratação pós-criopreservação e prenhez pós-transferência. Folículos ovarianos foram aspirados, dois dias antes da aplicação de 200mg de FSH (dose única) e 24h após a aplicação do FSH as vacas foram novamente aspiradas. O procedimento foi repetido três vezes consecutivas sem intervalos. No controle (sem FSH) as aspirações foram realizadas a cada 15 dias. A análise estatística considerou significância de 5% para as taxas de oócitos, embriões, criopreservação e prenhez. Ao comparar os dados tratados com ou sem FSH, foi possível observar que a recuperação total média de oócitos não diferiu ($p > 0,05$) entre o grupo controle ($12,3 \pm 2,4$, $11,5 \pm 2,4$ e $12,3 \pm 3,0$) e os animais tratados com FSH ($11,3 \pm 2,1$, $10,8 \pm 2,0$ e $10,7 \pm 1,2$) ou entre as 3 sessões OPU, respectivamente. As vacas Girolando tratadas com FSH ($64,5 \pm 3,1$) apresentaram maior porcentagem média ($p < 0,05$) de oócitos viáveis em relação às vacas controle ($54,4 \pm 3,3$). Embora houvesse diferenças na porcentagem de oócitos viáveis, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na porcentagem de blastocistos entre o controle ($39,8 \pm 2,6$) e as vacas tratadas com FSH ($37,8 \pm 2,5$). As taxas de reidratação do blastocisto não diferiram ($p > 0,05$) independentemente do tratamento dos animais, controle ($59,3 \pm 9,7$) ou tratados com FSH ($55,6 \pm 6,3$). Também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez de blastocistos criopreservados (ou não) entre o controle ($37,5 \pm 3,7$ e $45,0 \pm 4,6$) ou grupo de vacas tratadas com FSH ($40,0 \pm 7,0$ e $38,1 \pm 3,6$), respectivamente. Embora o tratamento com FSH não tenha aumentado a recuperação média de oócitos, blastocistos ou prenhez, ainda assim, foi positivo, uma vez que existe uma possibilidade de otimização dos animais em períodos curtos, facilitando o manejo de animais destinados à produção de leite.

Palavras-chave: Bovino; Embriões; Folículos; Oócito; Aspiração folicular

MARCHI, Bárbara Leticia. EFFICIENCY OF GIROLANDO COWS TREATED WITH FSH IN OOCYTE RECOVERY, EMBRYO PRODUCTION *IN VITRO* AND PREGNANCY RATE. 2017. Dissertação de Mestrado Acadêmico Saúde e produção de Ruminantes (Mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2018.

ABSTRACT

In the present study we compared Girolando donors treated with FSH in a single dose and aspiration 24 hours after the application of the hormone and its effects of treatments on the oocyte recovery, *in vitro* embryo production, post-cryopreservation (re-expansion) and post-transfer pregnancy rates. Ovarian follicles were aspirated two days before 200mg FSH injection (single dose) and the cows were aspirated again 24 hours after FSH treatment. The procedure was repeated three consecutive times without intervals. The control group (FSH-free) was subjected to aspirations every 15 days. Statistical analysis set 5% significance. When comparing treated donors with or without FSH, it was possible to observe that the mean total recovery of oocytes did not differ ($p>0.05$) between the control group (12.3 ± 2.4 , 11.5 ± 2.4 and 12.3 ± 3.0) and FSH treated animals (11.3 ± 2.1 , 10.8 ± 2.0 and 10.7 ± 1.2) or between the 3 OPU sessions, respectively. The Girolando cows treated with FSH (64.5 ± 3.1) had a higher average percentage ($p<0.05$) of viable oocytes compared to control cows (54.4 ± 3.3). Although there were differences in the percentage of viable oocytes, there was no significant difference ($p>0.05$) in the percentage of blastocysts between the control (39.8 ± 2.6) and treated FSH cows (37.8 ± 2.5). The blastocyst rehydration rates did not differ ($p>0.05$) regardless of the treatment of the animals, control (59.3 ± 9.7) or treated with FSH (55.6 ± 6.3). There was also no significant difference ($p>0.05$) in the pregnancy rates of cryopreserved (or not) blastocysts between the control (37.5 ± 3.7 and 45.0 ± 4.6) and the group of cows treated with FSH (40.0 ± 7.0 and 38.1 ± 3.6), respectively. Although FSH treatment did not increase oocyte, blastocyst or pregnancy mean recovery, it was still positive, since there is a possibility of optimization of the animals in short periods, facilitating the management of animals destined to milk production.

Keywords: Bovine; Embryo; Follicles; Oocyte; Ovum Pick Up

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: OPU A CADA TRÊS DIAS COM APLICAÇÕES DE 200 MG DE FSH 24 HORAS ANTES DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM TRÊS PROCEDIMENTOS CONSECUTIVOS.....	14
FIGURA 2: ESQUEMATIZAÇÃO DE ENVAZE DE BLASTOCISTOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO EM PALHETA DE 0.25 ML.....	16
FIGURA 3: DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. .	17
FIGURA 4: A VALIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO TOTAL DE OÓCITOS RECUPERADOS EM 3 SESSÕES DE CAPTAÇÃO DE ÓVULOS (OPU) REALIZADAS EM VACAS GIROLANDO TRATADAS COM HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) OU NÃO.....	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO EM VACAS TRATADAS COM OU SEM HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH).....	19
TABELA 2: RE-EXPANSÃO DE EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS E TAXAS DE PREENHEZ DE DOADORAS TRATADAS OU NÃO COM HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH).....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	ESPECÍFICOS.....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	4
3.2	FORMAÇÃO DOS OÓCITOS.....	5
3.3	FORMAÇÃO DOS FOLÍCULOS.....	6
3.4	FOLÍCULO DOMINANTE	8
3.5	HORMÔNIOS FOLÍCULO ESTIMULANTE	10
3.6	ASPIRAÇÃO FOLICULAR (<i>OVUM PICK UP</i> - OPU)	10
3.7	IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	SELEÇÃO DAS DOADORAS	13
4.2	ASPIRAÇÃO FOLICULAR (<i>OVUM PICK UP</i> - OPU)	13
4.3	SELEÇÃO DOS OÓCITOS	14
4.4	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	15
4.5	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	15
4.6	CRIOPRESERVAÇÃO	16
4.7	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E DIAGNOSTICO DE GESTAÇÃO... 16	
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
5.1	RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> ..	18
5.2	TAXA DE PRENHEZ.....	19
6.	DISCUSSÃO.....	20
7.	CONCLUSÕES.....	23
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Os ovários dos mamíferos são responsáveis pela síntese e secreção de hormônios e moléculas, que são essenciais para o desenvolvimento folicular e/ou oocitário, bem como para as funções reprodutivas (Van Den Hurk e Zhao, 2005; Adams *et al.*, 2008; Gervasio *et al.*, 2014). Ondas de folículos são continuamente recrutadas ao longo da vida reprodutiva das espécies bovinas durante os ciclos ovariano; com o desenvolvimento de 2 ou 3 folículos dominantes (2 ou 3 ondas foliculares/ciclo) por ciclo, no entanto, apenas um folículo dominante, desenvolve-se até a ovulação (na última onda folicular), enquanto os outros folículos gradualmente se tornam atresico durante a fase de crescimento folicular (Baruselli *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2016). A dominância folicular está associada à redução nos níveis de concentração plasmática do hormônio folículo estimulante (FSH). Os outros folículos (subordinados) interrompem seu crescimento, tornam-se atresicos e o recrutamento de novos folículos é bloqueado, fato que reduz o número e a qualidade dos folículos inicialmente recrutados (Nasser *et al.*, 1993; Ginther *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2008). Esses eventos ovarianos geraram um amplo interesse no campo da biotecnologia reprodutiva, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de protocolos hormonais para estimulação ovariana capaz de suportar o crescimento folicular, a fim de evitar que os folículos se tornem atresico e permitir a coleta de um maior número de oócitos viáveis a serem utilizados na produção embrionária *in vitro* ou na coleta de embriões *in vivo* (De Roover *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2009; Viana *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012). O tratamento com FSH pode ser usado como uma alternativa à recuperação de oócitos através da Aspiração folicular (OPU), a fim de minimizar os efeitos negativos resultantes do folículo dominante (Mihm *et al.*, 1997; Goodhand *et al.*, 1999; Ginther *et al.*, 2017). FSH adia a seleção do folículo dominante, bem como a atresia dos subordinados, e aumenta o diâmetro médio dos folículos tornando-os disponíveis para OPU (Mihm *et al.*, 1997; Goodhand *et al.*, 1999; Ginther *et al.*, 2017). A administração de FSH exógena permite que folículos, que não teriam sido selecionados através das mudanças de desenvolvimento, tornarem dominantes (Lucy, 2007; Ginther *et al.*, 2017).

Alguns fatores podem influenciar a resposta do desenvolvimento folicular ao FSH, a saber: variação da concentração de FSH, método de administração e

freqüência, e sua interação com o hormônio luteinizante (Kelly *et al.*, 1997). As especificidades reprodutivas de *Bos indicus* e *Bos taurus* também devem ser levadas em consideração no momento da administração, transferência de embriões e técnicas de aspiração folicular para produzir embriões *in vitro* (Baruselli *et al.*, 2007).

Bos indicus e *Bos taurus* fêmeas mostram crescimento folicular ovariano semelhante durante o ciclo estral; no entanto, vale ressaltar algumas diferenças significativas: os folículos de fêmeas de *Bos indicus* mostram ciclos de diâmetro menor e quatro ondas podem ser observados (Castilho *et al.*, 2000; Bó *et al.*, 2003; Silva-Santos *et al.*, 2014). As fêmeas *Bos indicus* são mais sensíveis ao tratamento com FSH do que *Bos taurus* (25), recrutam mais folículos por onda de crescimento folicular ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$) (Carvalho *et al.*, 2008) e destacam-se na produção de embriões *in vitro* quando comparados a *Bos taurus* (Guemra *et al.*, 2014). Essas diferenças podem ter implicações no sucesso de tratamentos que manipulam o desenvolvimento folicular.

No Brasil, a maioria dos sistemas de produção leiteira usa o gado Girolando, que é um cruzamento da raça Holandes (*Bos taurus*) com a raça Gir (*Bos indicus*), que mostrou produtividade, rusticidade e adaptações térmicas (Santos Filho *et al.*, 2001; Alves, Alves, Lucio, *et al.*, 2014; Alves, Alves, Martins, *et al.*, 2014). A raça Girolando (padrão racial, 5/8 Holandes + 3/8 Gir) é adaptada ao clima tropical brasileiro, caracterizada por um clima sazonal e semi-úmido com verões chuvosos e invernos secos (Alves, Alves, Lucio, *et al.*, 2014). De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Girolando (2017), a raça Girolando é responsável por cerca de 80% do leite produzido no Brasil (Abcg, 2017).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo pesquisou vacas Girolando doadoras de oócitos, tratadas com uma única dose de FSH e submetidas a OPU 24 horas após a aplicação do hormônio, em três procedimentos consecutivos, a fim de comparar os efeitos sobre a recuperação dos ovócitos, a produção *in vitro* de embriões, a criopreservação (re-expansão) e taxas de prenhez.

2.1 Específicos

- Avaliar a recuperação de oócitos nas doadoras Girolando tratadas ou não com FSH.
- Avaliar produção *in vitro* de embriões de doadoras tratadas ou não tratadas com FSH
- Avaliar a criopreservação de embriões *in vitro* de doadoras tratadas ou não tratadas com FSH
- Avaliar a taxa de prenhez de embriões *in vitro* de doadoras tratadas ou não tratadas com FSH

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Oogênese e foliculogênese

Segundo RÜSSE (Rüsse, 1983), a oogênese em ruminantes consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até o estágio de oócito haplóide fecundado. Em ovinos e bovinos, ainda na vida fetal, por volta do 20° e 30° dias de gestação, respectivamente, ocorre a migração de CGP do saco vitelíneo, para a região das gônadas primitivas. Após um processo marcado pelo crescimento celular e redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP, no interior do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias (Gordon, 2003). Dois tipos de células germinativas com funções diferentes resultam da última divisão mitótica das CGP. Uma inicia, imediatamente, outra divisão mitótica e dá origem a uma linha de células oogoniais, enquanto a outra permanece em intérfase e divide-se periodicamente, originando novas CGP que se diferenciarão posteriormente em oogônias. A transformação de oogônia em oócito é marcada pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno, preparando a célula para divisão meiótica. Em seguida, os oócitos passam pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica. No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio, pelo menos, até a puberdade. Neste período, imediatamente antes da ovulação, com os picos de LH e FSH, os oócitos que terminaram seu crescimento retomam a meiose e o núcleo passa do estágio de diplóteno para diacinese. Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário (Betteridge *et al.*, 1989).

Inicia-se, a segunda divisão meiótica, que evolui até a metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose. O oócito permanece neste estágio até ser fecundado, quando então, completa a meiose II e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado.

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, tendo início com o surgimento do folículo

primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (Saumande, 1991). Na espécie bovina, entre 120 e 140 dias da vida embrionária, uma camada de células somáticas planas, conhecidas também como células da pré-granulosa, originárias do epitélio celômico, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (Rüsse, 1983; Wandji *et al.*, 1992). Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram em um período de quiescência. A proliferação celular é retomada somente quando um folículo primordial quiescente começa a crescer, dias, meses ou anos após a sua formação (Hirshfield, 1991) para transformar-se em folículos em crescimento, isto é, primários e secundários, e chegar até os estágios de folículo antral e pré-ovulatório.

O crescimento do folículo até estágio de formação de antro não é necessariamente dependente de gonadotrofinas. Por outro lado, a formação do antro e o crescimento final dos folículos são completamente dependentes de FSH e LH (Hafez e Hafez, 2013).

3.2 Formação dos oócitos

As células germinativas primordiais dão origem aos gametas e são caracterizadas por sua forma oval ou redonda, com contorno irregular e grande núcleo com nucléolos proeminentes. Em avaliações realizadas por ultraestrutura mostraram que estas células contêm, no citoplasma, ribossomos, mitocôndrias, grânulos de glicogênio, gotículas de lipídio em grande quantidade e retículo endoplasmático e complexo de Golgi pouco desenvolvidos. Estas células por sua vez diferenciam-se em ovogônias, que dão origem a todos os oócitos da gônada feminina. As ovogônias tem um número predeterminado de divisões mitóticas, espécie-específica. No fim do ciclo de divisões mitóticas, as ovogônias aumentam de tamanho e entram em prófase I na primeira meiose, diferenciando-se, assim, como ovócitos primários. A prófase da primeira meiose é dividida em cinco estágios sequenciais: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Porém, o processo meiótico no ovócito é interrompido ainda no estágio na prófase I, antes de completar o estágio de diplóteno, também denominado de dictióteno. O ovócito permanece neste estágio da divisão celular até o início da maturação ovocitária no período da maturidade sexual (Adona *et al.*, 2015). Nos bovinos, a formação dos ovócitos primários ocorre entre 75 e 80 dias após a concepção.

Valido lembrar que os ovários possuem células germinativas mitoticamente ativas que sustentam a formação de novos ovócitos e folículos. Sendo assim, com a formação de novos folículos ovarianos durante todo o período reprodutivo pode compensar a atresia de uma parcela significativa do pool folicular e pode assegurar a preservação do número constante de folículos.

3.3 Formação dos folículos

Através das fases de mitose para meiose as ovogônias se transformam em ovócitos primários e folículos primordiais ao redor do ovócito, contendo uma camada de 4 a 8 células somáticas, chamadas pré-granulosas e uma lâmina basal formando a primeira categoria de folículo, denominado folículo primordial (Gonçalves *et al.*, 2008).

Na maioria das espécies estudadas, as células da granulosa dos folículos primordiais podem ser originadas das células mesoteliais ou das células mesonéfricas, ou ainda de ambas (Gonçalves *et al.*, 2008). Os folículos primordiais estão localizados na região periférica do córtex ovariano se apresentam em dois formatos de células da granulosa: pavimentoso e cúbico. Os folículos primordiais, primários e secundários aparecem por volta de 90, 140 e 210 dias no ovário fetal de bovino, respectivamente (Gonçalves *et al.*, 2008).

Os folículos permanecem quiescentes nos ovários até o recrutamento e o crescimento de um pool de folículos primordiais da população ovariana. Diariamente, um grupo desses folículos é recrutado do estoque de folículos primordiais (Gonçalves *et al.*, 2008). Estudos morfométricos sugerem que o crescimento dos folículos é baseado na ordem em que são formados. Conseqüentemente, os folículos primordiais transformam-se em folículos primários de acordo com a ordem de formação, e essa transformação pode acontecer após alguns dias, anos ou décadas, dependendo da espécie (Gonçalves *et al.*, 2008). A classificação em folículos primários se dá quando uma única camada de células da granulosa, com formato cuboide, cerca o ovócito. A transição de folículos primordiais para folículos primários é realizada através de um processo de maturação muito lento, visto que o diâmetro do ovócito muda lentamente (Gonçalves *et al.*, 2008).

Nos folículos primordiais e primários, a comunicação entre o oócito e as células da granulosa é aparentemente mediada por endocitose em bovinos (Hafez e Hafez, 2013). Nos bovinos os folículos primários apresentam os primeiros sinais de formação da zona pelúcida (Hyttel *et al.*, 1997).

A progressão do folículo ao estágio secundário é caracterizada pela formação da segunda camada de células da granulosa e pela deposição inicial do material da zona pelúcida em torno do ovócito, que aumenta de tamanho (Gonçalves *et al.*, 2008).

Os folículos secundários possuem um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (Gonçalves *et al.*, 2008). Quando duas a três camadas de células da granulosa são formadas, as células da teca podem ser visualizadas em torno da membrana basal (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Bk *et al.*, 1995) e a zona pelúcida pode ser identificada de forma evidente em bovinos (Hyttel *et al.*, 1997). Nos folículos secundários e estágios subsequentes, a comunicação entre as células da granulosa e o oócito é realizada por junções intercomunicantes do tipo GAP que são formadas entre os dois tipos celulares. Estruturas específicas do oócito, como os grânulos da cortical e o espessamento progressivo da zona pelúcida podem ser evidenciadas nos folículos secundários em bovinos (Hyttel *et al.*, 1997).

Os folículos ovarianos são classificados, em termos gerais, em pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários e são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circunda o ovócito. Por outro lado, os folículos antrais são aqueles que apresentam cavidade antral, ou seja, presença de líquido folicular, também denominados folículos terciários, pré-ovulatórios ou folículo de Graaf (Gonçalves *et al.*, 2008). Estes representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular. O crescimento terminal de folículos antrais é um processo altamente dependente de gonadotrofinas que corresponde ao início das ondas foliculares, seleção de folículos dominantes e maturação dos folículos pré-ovulatórios (Monniaux *et al.*, 1997).

3.4 Folículo dominante

A partir do momento em que um folículo primordial começa a crescer, este processo continua ininterruptamente até a ovulação ou atresia (Hirshfield, 1991). O crescimento terminal de folículos antrais é um processo altamente dependente de gonadotrofinas que corresponde ao início das ondas foliculares, seleção de folículos dominantes e maturação dos folículos pré-ovulatórios (Monniaux *et al.*, 1997).

Os folículos dominantes são caracterizados por uma rede vascular bem elaborada. Essas finas redes de capilares estão localizadas entre as camadas das células da teca dos folículos pré-ovulatórios, até próximo às camadas das células da granulosa. Os nutrientes e hormônios são fornecidos por difusão em um fluxo bidirecional entre as células da granulosa e a rede de capilares. O aumento do fluxo de sangue para as camadas das células da teca do folículo dominante resulta no aumento sistêmico do suprimento de hormônios gonadotróficos, fatores hormonais e bioquímicos, necessários para o desenvolvimento e ovulação do folículo (Gonçalves *et al.*, 2008).

A atividade esteroidogênica e produção de inibina pelos folículos aumenta drasticamente durante esta fase, resultando em uma importante modulação da secreção de gonadotrofinas pelo clássico efeito de feedback (Fortune, 1994). Durante o desenvolvimento folicular nesta fase, uma importante etapa é a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa, pois o LH é progressivamente hábil para promover a maturação folicular (Gonçalves *et al.*, 2008).

O FSH exerce um papel importante na expressão de receptores de FSH e LH bem como na diferenciação das células da granulosa (Rao *et al.*, 1978). Durante o ciclo estral ocorre uma estreita relação entre as flutuações das concentrações de FSH e as ondas foliculares em vacas (Adams *et al.*, 1992).

Mais precisamente, um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH precede cada onda folicular e pode determinar o seu início. Por outro lado, uma diminuição nas concentrações de FSH, em consequência do aumento da secreção de inibina e estradiol pelo(s) folículo(s) dominante(s), previne o aparecimento de nova onda e está associado com a regressão dos folículos não dominantes, o que sugere que o FSH é o indutor hormonal da foliculogênese terminal (Monniaux *et al.*, 1997).

SOUZA *et al.* (Souza *et al.*, 1996) mostraram que o crescimento folicular e a

secreção de estradiol ocorre em forma de ondas. Uma média de três ondas de desenvolvimento folicular ocorre em ovinos durante o período de 17 dias do ciclo estral, com as ondas emergindo, aproximadamente, a cada cinco dias (Silva *et al.*, 2002; Hafez e Hafez, 2013).

MONNIAUX *et al.* (Monniaux *et al.*, 1997) sugeriram que, provavelmente nunca existem dois folículos iguais em uma onda. Em ovelhas, importantes diferenças na atividade aromatase das células da granulosa e receptores de LH foram observados em folículos saudáveis de 3 μ m de diâmetro no mesmo ovário (Monniaux *et al.*, 1997). Os folículos de um mesmo tamanho podem diferir na sua taxa de crescimento e/ou no estágio de diferenciação das células da granulosa levando a uma hierarquia funcional entre os folículos de uma onda. Além disso, a vascularização desenvolvida durante as fases finais de crescimento folicular, provavelmente propiciam um maior suprimento de hormônios, particularmente gonadotrofinas, para o maior folículo (Van Den Hurk *et al.*, 1997). Uma maior capacidade de produção de AMPc pelas células da granulosa em resposta ao estímulo do FSH aumenta consideravelmente durante o crescimento folicular terminal (Rao *et al.*, 1978). Em consequência, grandes folículos com células da granulosa em estágio mais avançado de diferenciação, podem continuar o seu desenvolvimento na presença de baixas concentrações de FSH que não possibilitam o desenvolvimento de pequenos folículos de uma onda (Monniaux *et al.*, 1997). Finalmente a aquisição de responsividade ao LH pelas células da granulosa de maiores folículos permitirão que estes folículos tornem-se gradualmente menos dependente das flutuações de FSH. Por este mecanismo, as pequenas diferenças funcionais pré-existente entre os folículos de uma onda podem, provavelmente, serem acentuadas pelo ambiente hormonal, resultando na seleção de folículos dominantes, e atresia do restante dos folículos de uma onda (Monniaux *et al.*, 1997).

No final da fase folicular, o grande aumento na pulsabilidade do LH associado com um marcado aumento do número de receptores de LH nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, estimula o seu desenvolvimento terminal e possibilita a manutenção da dominância folicular (Ravindra e Rawlings, 1997).

A ovulação ocorre em consequência de uma interação dinâmica entre o pico pré-ovulatório causado pelo LH e os fatores locais, incluindo os esteroides (Hafez e Hafez, 2013). O pico de LH provoca mudanças estruturais e bioquímicas, que conduzem à ruptura do folículo ovulatório, tendo, como resultado, a extrusão do

ovócito maturo e o desenvolvimento subsequente do corpo lúteo (Gonçalves *et al.*, 2008; Adona *et al.*, 2015).

Alguns fatores podem afetar o crescimento folicular terminal, como: nutrição, gestação e amamentação. Em vacas com alimentação restrita, observa-se redução do peso corporal e, conseqüentemente, redução do número de folículos e do tamanho do corpo lúteo (Gonçalves *et al.*, 2008; Hafez e Hafez, 2013).

3.5 Hormônios folículo estimulante

O hipotálamo é uma glândula localizada na base do cérebro qual secreta o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). Este estimula a liberação de hormônios, como o hormônios folículo estimulante (FSH). O FSH é um hormônio glicoprotéicos sintetizados pela hipófise anterior que regulam a função ovariana (Gonçalves *et al.*, 2008; Hafez e Hafez, 2013).

Hormônio folículo-estimulante estimula o crescimento e a maturação do folículo ovariano ou folículo de *De Graaf*. O FSH por si só não causa secreção de estrógenos no ovário; ao contrário, ele necessita da presença do LH para estimular a produção estrogênica (Gonçalves *et al.*, 2008; Hafez e Hafez, 2013). No macho, o FSH atua nas células germinais, nos túbulos seminíferos dos testículos e é responsável pela espermatogênese até o estágio de espermatócitos secundários; num passo mais diante, os andrógenos dos testículos atuam nas fases finais da espermatogênese (Gonçalves *et al.*, 2008; Hafez e Hafez, 2013).

3.6 Aspiração folicular (*Ovum pick up* - OPU)

A técnica de aspiração folicular orientada por ultra-sonografia (OPU) foi desenvolvida, na década de 80, para atender à demanda por um procedimento para coleta de complexos cumulus-oócito (oócitos) que fosse menos traumática que as abordagens cirúrgicas ou por laparoscopia até então utilizadas. A aspiração folicular orientada por ultra-som foi posteriormente adaptada para uso veterinário, sendo rapidamente reconhecida como a técnica de eleição para a recuperação de oócitos (Galli *et al.*, 2001). Dentre as reconhecidas vantagens da técnica, estão o fato de ser

pouco invasiva, não depender de pré- estimulação hormonal, poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial. Também contornou o principal obstáculo ao uso comercial da fertilização *in vitro* (FIV), que era a recuperação de oócitos em doadora viva, sendo considerada a melhor alternativa aos programas clássicos de produção de embriões por superovulação (Bousquet *et al.*, 1999).

As baixas eficiências dos sistemas inicialmente utilizados limitaram, nas décadas de 80 e 90, a expansão do uso comercial da aspiração folicular, que se concentrou em animais de alto valor genético, mas com problemas de fertilidade adquiridos ou histórico de insucesso na superovulação (Bols *et al.*, 1996). Nos últimos anos, contudo, este cenário vem mudando, com o uso intensivo de doadoras em reprodução e um conseqüente aumento na produção *in vitro* de embriões bovinos em todo o mundo, particularmente na América do Sul e Ásia (Thibier, 2004). Esta evolução foi surpreendente, considerando-se que as taxas de produção de blastocistos obtidas por diferentes grupos de pesquisa se mantiveram na faixa de 25 a 40%. O aumento no número e/ou qualidade dos oócitos destinados à fertilização *in vitro*, entretanto, pode compensar parcialmente a baixa eficiência dos sistemas de cultivo atualmente disponíveis.

Devido as características físicas dos equipamentos de ultra-sonografia (formação de imagem e resolução) determinam que apenas folículos em fase antral, e apresentando diâmetros superiores à dois a três milímetros, possam ser identificados e, conseqüentemente, puncionados. Estes folículos representam apenas uma pequena fração do total de folículos presentes nos ovários e seu número, em um determinado momento, depende da mobilização da reserva ovariana, do desenvolvimento folicular nas fases iniciais e sua associação com o status metabólico e endócrino da doadora, e da dinâmica do crescimento na fase antral. Maximizar o número e qualidade de folículos em fase antral e, conseqüentemente, disponíveis para aspiração, é uma das principais estratégias para melhoras a recuperação de oócitos destinados à FIV.

3.7 Importância da produção *in vitro* de embriões

Como o Brasil é o primeiro país em número de produção de embriões *in vitro*

do mundo. Em virtude disto, as pesquisas com fêmeas como alvo de aproveitamento dos gametas são mais comuns.

Sabe-se que as fêmeas bovinas possuem ao nascimento mais de 100.000 oócitos e na puberdade este número descesse para aproximadamente 70.000 oócitos em seus ovários (Hafez e Hafez, 2013). Durante a fase reprodutiva, alguns folículos são recrutados e os oócitos começam a crescer e maturar. No entanto, de todo esse potencial *in vivo*, somente um oócito será ovulado, e o restante sofrerá atresia (Hardy *et al.*, 2000). Assim, a produção *in vitro* de embriões se apresenta como uma técnica alternativa para incrementar o uso de oócitos bovinos (Bousquet *et al.*, 1999). Deste modo, a técnica de produção *in vitro* de embriões tem o potencial de resgatar os oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até o estágio de blastocisto, quando estarão aptos à transferência a receptoras previamente sincronizadas (Chaves *et al.*, 2010).

A importância dessa tecnologia é a sua utilidade para maximizar produção animal com menor custo e vem sendo estudada durante vários anos. A possibilidade de produzir, em escala comercial, doses de sêmen enriquecido com espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y, aumentará os benefícios da utilização da inseminação artificial (IA), conferindo-lhe um papel relevante na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, a menos que especificado de outra forma. Todos os procedimentos nesta experiência foram aprovados pelo Comitê da Universidade Norte do Paraná e realizados de acordo com o bem-estar e a ética animal.

4.1 Seleção das doadoras

Foram utilizados 12 doadoras de oócitos divididos em dois grupos (controle e tratamento com FSH) com seis animais cada, da raça Girolando 5/8 (cruzamento entre gado Holandes e Gir) de 4 a 6 anos, que no período de desenvolvimento experimental estavam na fase folicular (cíclica) apresentando boa condição corporal, foram selecionados através de características zootécnicas de acordo com a raça Girolando, com produção de leite dos animais (± 20 litros de dia) e população folicular (folículos ≥ 3 mm) encontrados em seus ovários maior que 10 folículos. Os dois grupos foram selecionados para assegurar populações foliculares semelhantes. Por serem animais de produção leiteira, foram preparados para o período experimental; não estavam em lactação ou prenhas. Os doadoras selecionadas foram mantidas em pastagem de grama-estrela (genero *Cynodon*) e elas tiveram acesso a água e sal mineral *ad libitum*, além de suplementação com silagem de milho e alimentação equilibrada.

4.2 Aspiração folicular (*Ovum pick up* - OPU)

A OPU para os animais tratados com FSH foi feita a cada 3 dias e para as doadoras controle (não tratados com FSH) a cada 15 dias, em ambos os grupos, a OPU foi sequencial. Para o início do estudo foram removidos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro, para ambos os grupos. Após dois dias da remoção dos folículos ≥ 3 mm de diâmetro nos animais do grupo tratado com FSH, foram aplicados 200 mg de FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health USA, Inc.) por via intramuscular (i.m.). Vinte e quatro (24) horas após a aplicação do FSH, os animais foram submetidos à nova OPU. Este procedimento foi repetido 3 vezes consecutivas após a OPU do início do estudo. Os animais no grupo de controle foram submetidos a aspiração

folicular a cada 15 dias, de acordo com a técnica OPU previamente padronizada (Fig. 1).

As aspirações foliculares foram realizadas através de um transdutor convexo (faixa de frequência: 5-12 MHz) montado em um dispositivo intravaginal e acoplado ao equipamento de ultra-som Sonoscape A5 Vet (Mindray Medical International Ltd. China). Os oócitos aspirados durante OPU foram colocados em um tubo de polipropileno de 50 mL (Corning Incorporated, USA, 430290) contendo 15 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Nutricell - Nutrientes Celulares Ltd., Brasil) suplementada com 1% de soro de bovino fetal (FBS), 50 µg/mL de gentamicina e 10 UI/mL de heparina de sódio (Liquemine) (Roche Farmacêutica, Brasil); o tubo foi acoplado a uma bomba de vácuo BV-003D (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brasil).



Figura 1: OPU a cada três dias com aplicações de 200 mg de FSH 24 horas antes da aspiração folicular em três procedimentos consecutivos.

4.3 Seleção dos oócitos

Os oócitos aspirados foram depositados em um filtro (ECE 051- Bioniche Animal Health USA, Inc.) e lavados em PBS com 1% de FBS e 50 µg/mL gentamicina. Na classificação (estereomicroscópio Nikon, SMZ1000) foram considerados oócitos viáveis aqueles que apresentavam uma ou mais camadas de células do cumulus compactas e com citoplasma homogêneo ou com leve granulação. Os oócitos foram colocados em criotubos de 1,5 mL (Corning Incorporated, USA, 430487) contendo 1 mL de meio TCM199-HEPES (M7528) com 10% FBS, 50 µg/mL de gentamicina, 100 µM de cisteamina e 0,2 µM de piruvato,

aconicionados em uma garrafa térmica por aproximadamente 4 horas à 36° C e encaminhados ao laboratório de fertilização *in vitro* (Guemra *et al.*, 2014).

4.4 Maturação *in vitro*

Os oócitos selecionados foram maturados *in vitro* em TCM-199 (M4530) suplementado com 10% de FBS, 5,0 µg/mL de Lutropin-V (Bioniche Animal Health USA, Inc.), 0,5 µg/mL de Folltropin-V (Bioniche Animal Health USA, Inc.), gentamicina 50 µg/mL, piruvato a 0,2 µM e cisteamina a 100 µM. Os oócitos foram maturados *in vitro* durante 22 h em gotas de meio de maturação (100 µL) sob óleo mineral em uma placa de Petri (Corning Incorporated, EUA, 430166), a 38,5° C em uma estufa de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade relativa (Sovernigo *et al.*, 2017).

4.5 Produção *in vitro* de embriões

O sêmen congelado do mesmo lote e do mesmo touro (Girolando) de fertilidade conhecida foi utilizado para fertilização *in vitro*. O semen foi preparado por técnica de gradiente de densidade utilizando as soluções BoviPure e BoviDilute (Nidacon International AB, Suécia). Os oócitos foram fertilizados em meio de fertilização (Parrish *et al.*, 1988) com 2×10^6 células/mL em uma gota de 100 µL de meio sob óleo mineral em uma placa de Petri, durante um período de 18 horas (De Bem *et al.*, 2014). A cultura *in vitro* foi realizada em meio de oviduto fluido sintético (SOF) (Holm *et al.*, 1999) suplementado com solução de 2% de aminoácidos (BME), 1% de solução de aminoácidos não essenciais (MEM), 0,34 mM de tri citrato de sódio, mio-inositol 2,77 mM, FBS a 3%, BSA a 4 mg / ml, 0,75 mg/mL de glicina, 0,15 mg/mL de alanina e 0,09 mg/mL de glutamina em 100 µL de gotículas com uma monocamada de somático (cumulus) células. A cultura de embriões foi realizada a 38,5 ° C e uma atmosfera de 5% de CO₂ em ar. No sétimo dia de cultivo, após a fecundação *in vitro*, foi determinada a percentagem de blastocistos de acordo com os critérios do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

(Wright, 2000) e apenas embriões de classes I foram transferidos para vacas receptoras ou criopreservados.

4.6 Criopreservação

Os blastocistos foram transferidos para gotas de 300 μ L de meio de criopreservação (PBS suplementado com 20% FBS, 1.5 M de Etileno Glicol, 50 μ g/mL gentamicina, 0.2 μ M piruvato e 100 μ M cisteamina) para desidratação por 10 minutos. No decorrer da desidratação os embriões foram envazados em palheta de 0.25 mL (Figura 2). O congelador Freeze Control (CryoLogic Pty. Ltd. Australia) foi programado para -6° C e as palhetas com embriões foram mantidas nesta temperatura por 10 minutos. Decorridos 5 minutos, foi feito o congelamento na coluna dos embriões. A curva de congelação foi de 0.6° C por minuto até -32° C, seguida de estabilização por 10 minutos a -32° C. As palhetas foram mergulhadas e estocadas no nitrogênio líquido.

Os blastocistos foram descongelados por exposição das palhetas em ar por 10 segundos e mergulhadas em água a 36° C por um minuto. Os embriões foram novamente cultivados (SOF) por 2 horas a 38.5° C sob uma estufa de 5% CO₂ em ar e 100% de umidade relativa. Somente os embriões visualmente com expansão celular completa (reidratados) foram considerados viáveis e transferidos para receptoras previamente sincronizadas.

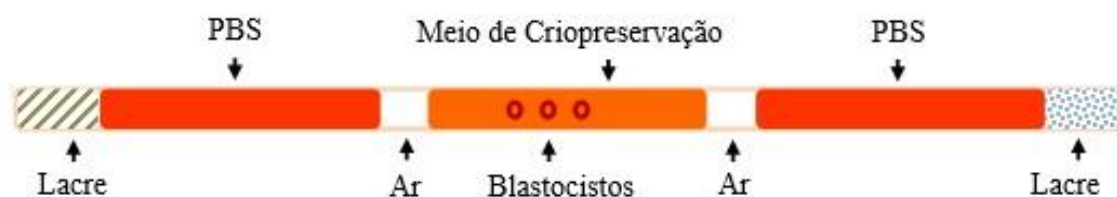


Figura 2: Esquemática de envaze de blastocistos para criopreservação em palheta de 0.25 mL.

4.7 Transferência de embriões e diagnóstico de gestação

As receptoras (½ sangue, cruzamento, Nelore e Pardo suíço) na fase folicular (cíclica) foram sincronizadas com um implante de progesterona intravaginal (Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Brasil) mais 2 mL (im) de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal, Brasil). Os implantes foram removidos no dia 8 e 300 UI (im) de eCG (Novormon, Syntex, Argentina), 150 g (im) d-cloprostenol (Preloban, Intervet, Brasil) e 1 mg (im) de estradiol cipionato (ECP, Pfizer, Brasil).

As transferências de embriões frescos ou criopreservados foram realizadas por meio de um método transcervical (não cirúrgico) no bico uterino ipsilateral ao corpo lúteo das receptoras que responderam à sincronização do estro e que apresentava um corpo lúteo de 18 mm² ou mais. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia transrectal, 60 dias após a transferência de embriões.

4.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software BioEstats 5.3 (Instituto Mamirauá, Brasil). O teste de Qui-quadrado foi usado para determinar a influência do tratamento (FSH) em dadoras Girolando em relação a frequências de oócitos totais e viáveis, blastocistos e prenhez. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (SD).

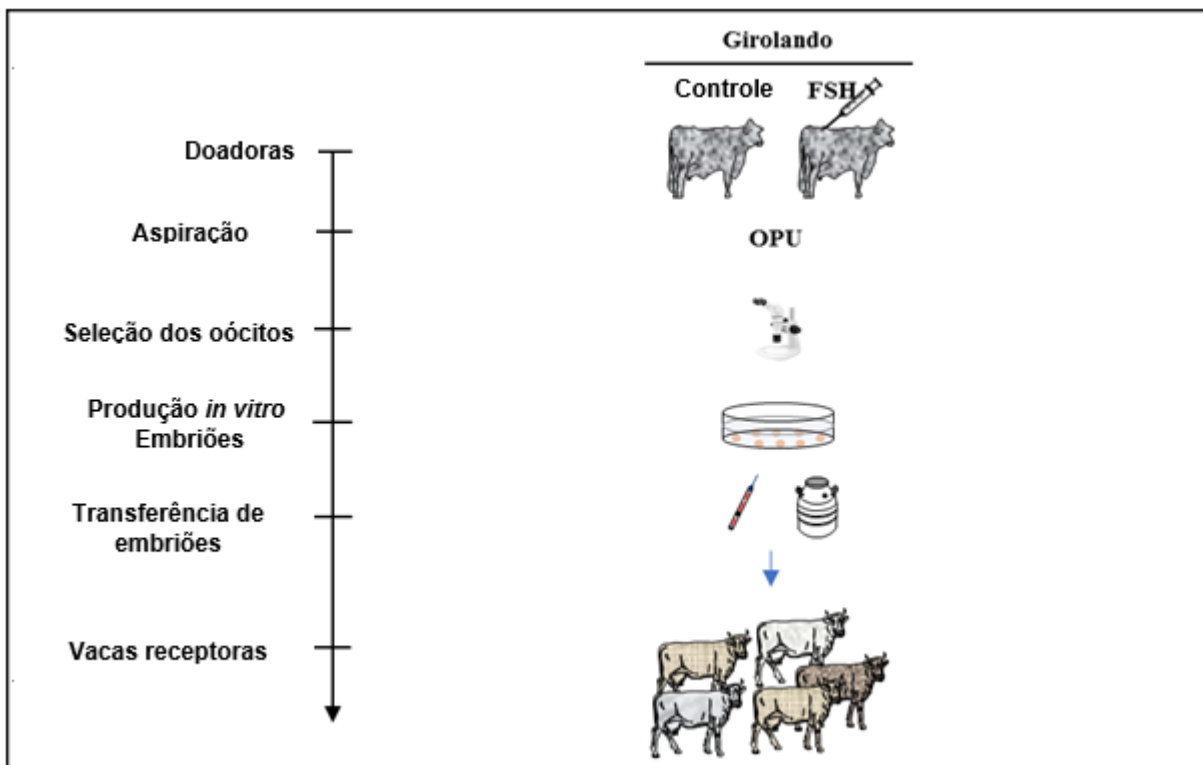


Figura 3: Diagrama simplificado do delineamento experimental.

5. RESULTADOS

5.1 Recuperação de oócitos e produção de embriões *in vitro*

Ao comparar as dadoras tratadas com ou sem FSH, foi possível observar que a recuperação total média de oócitos não diferiu ($p > 0,05$) entre o grupo controle ($12,3 \pm 2,4$, $11,5 \pm 2,4$ e $12,3 \pm 3,0$) e os animais tratados com FSH ($11,3 \pm 2,1$, $10,8 \pm 2,0$ e $10,7 \pm 1,2$) ou entre as 3 sessões OPU, respectivamente (Fig. 1).

As taxas médias de oócitos viáveis foram diferentes ($p < 0,05$) entre vacas Girolando tratadas ou não com FSH. No entanto, as vacas tratadas com FSH apresentaram uma percentagem média mais elevada ($p < 0,05$) de oócitos viáveis em comparação com vacas controle (Tabela 1).

Embora houvesse diferenças na percentagem de oócitos viáveis, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na percentagem de blastocistos entre as vacas de controle e de FSH tratadas (Tabela 1).

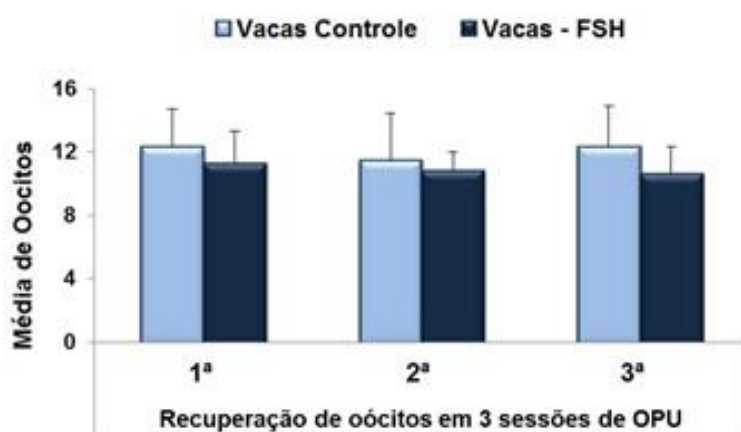


Figura 4: A valiação do número médio total de oócitos recuperados em 3 sessões de captação de óvulos (OPU) realizadas em vacas Girolando tratadas com hormônio folículo estimulante (FSH) ou não.

Tabela 1: Recuperação de oócitos e produção de embriões *in vitro* em vacas tratadas com ou sem hormônio folículo estimulante (FSH).

Tratamentos	Total de oócitos		Oócitos viáveis		Blastócitos D7*	
	N	N	N (% ± SD)	N (% ± SD)		
Vacas - Controle	217	118	6.6 (54.4±3.3) ^b	47 (39.8±2.6)		
Vacas – FSH	197	127	7.1 (64.5±3.1) ^a	48 (37.8±2.5)		

Letras diferentes (a-b) na mesma coluna indicam diferença entre tratamentos ($p < 0,05$). Porcentagem (%) mais o desvio padrão da média (\pm DP) de três repetições. * Dias pós-fertilização *in vitro*.

5.2 Taxa de prenhez

Os embriões criopreservados foram descongelados e cultivados durante 2 h para reidratação. No entanto, apenas os embriões re-expandidos foram transferidos para fêmeas receptoras previamente sincronizadas (Tabela 2). As taxas de reidratação do blastocisto (Tabela 2) não diferiram ($p > 0,05$) independentemente do tratamento dos animais. Também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez de blastocistos criopreservados (ou não) ou entre o controle e o grupo de vacas tratadas com FSH (Tabela 2).

Tabela 2: Re-expansão de embriões criopreservados e taxas de prenhez de doadoras tratadas ou não com hormônio folículo estimulante (FSH).

Tratamento	Embriões		Embriões Criopreservados			Embriões frescos	
	Total	Cryo ¹	Re-expansão	ET ²	Prenhez	ET ²	Prenhez
	N	N	N (% ± SD)	N	N (% ± SD)	N	N (% ± SD)
Vacas – Controle	47	27	16 (59.3±9.7)	16	6 (37.5±3.7)	20	9 (45.0±4.6)
Vacas – FSH	48	27	15 (55.6±6.3)	15	6 (40.0±7.0)	21	8 (38.1±3.6)

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). A porcentagem (%) mais o desvio padrão da média (\pm DP) de três repetições. ¹Cryopreservation (Cryo); ²Embryo transferência (ET).

6. DISCUSSÃO

A aspiração folicular destinada à obtenção de oócitos a serem utilizados para a produção *in vitro* de embriões pode ser afetada por vários fatores, prenhez, lactação, nutrição e variações individuais das doadoras (Chaubal *et al.*, 2006; Ireland *et al.*, 2011; Pontes *et al.*, 2011). No entanto, os protocolos de superestimulação folicular podem ser melhorados para resultar em maior eficiência na recuperação de oócitos compatíveis com o desenvolvimento e, conseqüentemente, beneficiariam a produção *in vitro* de embriões em programas de OPU em vacas leiteiras (Blondin *et al.*, 1997). No presente estudo, as doadoras da raça Girolando (vacas leiteiras) foram utilizadas para testar os efeitos do tratamento com FSH em dose única seguida de aspiração folicular após 24 horas de aplicação hormonal.

O efeito do uso de FSH no presente estudo, não afetou o número de oócitos totais recuperados por OPU, mas a proporção de oócitos viáveis recuperados foi aumentada em comparação ao controle. Estes resultados podem ser considerados positivos para o grupo de animais tratados com FSH, uma vez que existe a possibilidade de várias sessões de OPU, facilitando o manejo dos animais, a produção *in vitro* de embriões, aumentando o número de embriões transferidos e de prenhez em períodos mais curtos, concentrando a gestão dos animais destinados à produção de leite.

A administração de FSH foi utilizada para aumentar a população folicular disponível para OPU em doadores de oócitos Girolando, mas esse aumento na recuperação total de oócitos não ocorreu em comparação com animais não tratados submetidos a OPU em intervalos de 15 dias. No entanto, diferentes estudos mostram grandes variações nos resultados, alguns descrevem resultados positivos, enquanto outros mostram resultados negativos para a recuperação de oócitos, tendo em vista que há diferenças entre estudos, como raças dos animais, idades e protocolos de administração de FSH (Goodhand *et al.*, 2000; Chaubal *et al.*, 2006; Chaubal *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2017), mas na maioria dos estudos, as doses de FSH foram adotadas em 3 ou mais dias consecutivos, diferente da realizada neste estudo que fez uma dose única e OPU 24 horas após a aplicação da FSH (Goodhand *et al.*, 2000; Chaubal *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2017). No entanto, os dados sobre a eficácia da administração de uma única dose de FSH em intervalos curtos para a recuperação

de oócitos, como descrito neste estudo, permanecem escassos (Chaubal *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2016). Como já mencionado, no presente estudo, a falta de efeito significativo sobre o número total de oócitos recuperados encontrados no gado Girolando pode ser devido a raça ou a concentração administrada de FSH (200 mg) que, nesses animais, pode não ter sido ideal. Neste estudo, a raça Girolando ($\frac{5}{8}$) tem 62,5% de sangue *Bos Taurus* (Holandês) e de acordo com (Baruselli *et al.*, 2006) existem algumas diferenças fisiológicas entre os animais Zebu (*Bos indicus*) e Taurine (*Bos taurus*) que podem afetar os resultados para a superestimulação ovariana, em que os animais *Bos Taurus* são menos sensíveis ao FSH em comparação com os *Bos indicus* (Barros e Nogueira, 2001; Blondin *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2010).

Embora o tratamento com FSH tenha promovido um aumento na proporção de oócitos viáveis em relação ao número total de oócitos recuperados, este efeito não proporcionou aumento no rendimento de embriões produzidos in vitro. Esta observação deve-se provavelmente à qualidade dos oócitos submetidos à produção in vitro de embriões, que em ambos os grupos foi semelhante, uma vez que os oócitos selecionados apresentaram uma ou mais camadas de células cumulus compactas com citoplasma homogêneo ou com ligeira granulação. De acordo com alguns estudos, a taxa de produção in vitro de embriões é afetada pela qualidade intrínseca do oócito, enquanto que a qualidade do embrião é afetada pelo sistema de cultura in vitro (Rizos, D. *et al.*, 2002; Sananmuang *et al.*, 2011). Embora a proporção de oócitos viáveis tenha aumentado em animais tratados, a qualidade dos oócitos selecionados foi semelhante, de modo que as diferenças nas taxas de produção de embriões in vitro entre tratamentos não foram observadas.

O número total de oócitos e a proporção de oócitos viáveis neste estudo foram inferiores aos encontrados por (Pontes *et al.*, 2010), mas a porcentagem de embriões foi maior e a taxa de prenhez foi semelhante entre os estudos, embora o grau de sangue dos animais de Girolando fossem diferentes nos estudos (Pontes *et al.*, 2010) ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ sangue holandês). Essas diferenças entre os estudos podem estar associadas a uma grande variedade de fatores, mesmo em animais da mesma raça, tais como: efeitos do estresse térmico, novilhas ou vacas, nutrição entre outros (Adamiak *et al.*, 2005; Alves, Alves, Lucio, *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014). Mesmo com as semelhanças ou variações em comparação com outros estudos (raças e / ou protocolos), a porcentagem média da produção in vitro de embriões e taxa de

prenhez neste estudo, está de acordo com os encontrados na literatura (Pontes *et al.*, 2010; Cavalieri *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2017).

Os embriões produzidos *in vitro* são geralmente de menor qualidade quando comparados aos produzidos *in vivo* devido a alterações na metilação do DNA, diferenças na expressão gênica e alterações metabólicas que induzem o estresse celular *in vitro* (Rizos, D *et al.*, 2002; Steel e Hasler, 2003; Seidel, 2006; De Souza *et al.*, 2015; Salilew-Wondim *et al.*, 2015). Em geral, a taxa de sucesso na criopreservação de embriões de ruminantes produzidos *in vitro* é menor que a dos embriões produzidos *in vivo*. Além disso, a raça dos animais também parece ser um fator adicional entre as variáveis relacionadas à criopreservação bem-sucedida de embriões bovinos (Baruselli *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2015). Outros fatores também podem influenciar os resultados da criopreservação; entre eles, vale a pena destacar a qualidade dos oócitos, que podem ser afetados por uma grande quantidade de fatores ambientais, impactando na produção *in vitro* de embriões (Youngs, 2011; Sanches *et al.*, 2016; Sovernigo *et al.*, 2017). A qualidade do embrião é muito comprometida pelo cultivo *in vitro* (Simpson *et al.*, 1994; Seidel, 2006). As condições de cultivo para a produção *in vitro* de embriões e a criopreservação no presente estudo foram semelhantes independentemente do tratamento dos animais. O tratamento, bem como as taxas de oócitos e embriões viáveis, não influenciaram a sobrevivência do embrião a criopreservação ou a prenhez. A ausência de variação nas taxas de criopreservação e/ou prenhez nos diferentes tratamentos pode ser atribuída à qualidade similar de embriões criopreservados ou transferidos a fresco (classe I).

7. CONCLUSÕES

O tratamento das dadoras Girolando com FSH como descrito neste estudo não aumentou a recuperação de oócitos, a produção in vitro de embriões, a sobrevivência à criopreservação ou a taxa de prenhez. No entanto, o tratamento das vacas Girolando com FSH foi positivo, uma vez que existe uma possibilidade de várias sessões consecutivas de OPU a cada três dias, agilizando o processo da produção in vitro de embriões, aumentando assim o número de embriões transferidos e de prenhez dentro de períodos mais curtos, concentrando a gestão dos animais destinados à produção de leite.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCG. Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. **Associação Brasileira dos Criadores de Girolando 2017.**

ADAMIÁK, S. J. et al. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol Reprod**, v. 73, n. 5, p. 918-26, Nov 2005. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972884> >.

ADAMS, G. P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, Jan 1 2008. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980420> >.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 96, n. 2, p. 627-40, Nov 1992. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1339842> >.

ADONA, P. R. et al. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015. ISSN 2447-8938.

ALVES, B. G. et al. Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profile of serum and follicular fluid from Girolando dairy cows postpartum. **Anim Reprod Sci**, v. 146, n. 3-4, p. 117-25, May 2014. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24674823> >.

ALVES, B. G. et al. Metabolic profile of serum and follicular fluid from postpartum dairy cows during summer and winter. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 6, p. 866-74, 2014. ISSN 1031-3613 (Print)

1031-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23815864> >.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1483-96, Dec 01 2001. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768812> >.

BARUSELLI, P.; GIMENES, L.; SALES, J. Reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* females. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 6, 2007.

BARUSELLI, P. S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, Jan 7 2006. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290257> >.

BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 4, p. 134-41, Aug 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827362> >.

BETTERIDGE, K. J. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 38, p. 87-98, 1989. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2677352> >.

BK, C.; SCARAMUZZI, R.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 335-350, 1995.

BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol Reprod**, v. 66, n. 1, p. 38-43, Jan 2002. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751261> >.

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, n. 5, p. 803-13, Oct 1997. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728173> >.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 307-26, Oct 2003. ISSN 0378-4320. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818651> >.

BOLS, P. E. et al. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 1001-14, Apr 1 1996. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727859> >.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 59-70, Jan 1 1999. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729062> >.

CARVALHO, J. B. et al. 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. 167-75, Jan 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980904> >.

CASTILHO, C. et al. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2a and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 91-101, 2000. ISSN 0100-879X.

CAVALIERI, F. L. B. et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, Nov 26 2017. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29198975> >.

CHAUBAL, S. A. et al. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 719-28, Mar 2007. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140652> >.

CHAUBAL, S. A. et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1631-48, May 2006. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243385> >.

CHAVES, R. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 34, p. 37-49, 2010.

DA SILVA, J. C. B. et al. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 90, p. 65-73, Mar 1 2017. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166990> >.

DE ROOVER, R. et al. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reprod Domest Anim**, v. 43, n. 2, p. 239-45, Apr 2008. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226024> >.

DE SOUZA, D.; SALLES, L.; ROSA E SILVA, A. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 3, p. 191-197, 2015. ISSN 0100-879X.

FORTUNE, J. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994. ISSN 0006-3363.

GALLI, C. et al. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1341-57, Apr 1 2001. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327688> >.

GERVASIO, C. G. et al. The role of androgen hormones in early follicular development. **ISRN Obstet Gynecol**, v. 2014, p. 818010, 2014. ISSN 2090-4436 (Print)

2090-4436 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006485> >.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079-93, Oct 15 1999. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735114> >.

GINTHER, O. J. et al. An intraovarian mechanism that enhances the effect of an FSH surge on recovery of subordinate follicles in heifers. **Domest Anim Endocrinol**, v. 59, p. 67-74, Apr 2017. ISSN 1879-0054 (Electronic)

0739-7240 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28002761> >.

GINTHER, O. J. et al. Systemic effect of follicle-stimulating hormone and intraovarian effect of the corpus luteum on complete regression vs recovery of regressing wave-2 follicles in heifers. **Domest Anim Endocrinol**, v. 55, p. 51-9, Apr 2016. ISSN 1879-0054 (Electronic)

0739-7240 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773368> >.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIREDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008. ISBN 8572417443.

GOODHAND, K. L. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Anim Reprod Sci**, v. 63, n. 3-4, p. 145-58, Nov 01 2000. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989225> >.

GOODHAND, K. L. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, n. 5, p. 951-61, Apr 1 1999. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729017> >.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. CABI, 2003. ISBN 0851998488.

GUEMRA, S. et al. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982-7, Apr 15 2014. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24576716> >.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 1118710703.

HARDY, K. et al. In vitro maturation of oocytes. **Br Med Bull**, v. 56, n. 3, p. 588-602, 2000. ISSN 0007-1420 (Print)

0007-1420 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255547> >.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International review of cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991. ISSN 0074-7696.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997. ISSN 0093-691X.

IRELAND, J. J. et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2011. ISSN 1031-3613 (Print)

1031-3613 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366975> >.

KELLY, P. et al. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. **Anim Reprod Sci**, v. 46, n. 1-2, p. 1-14, Mar 1997. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231242> >.

KHAN, F. A. et al. Unilateral ablation of follicles ≥ 4 mm leads to compensatory follicle response from the contralateral ovary in heifers. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1605-14, May 2012. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341711> >.

KIM, I. H. et al. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 937-45, Mar 01 2001. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11291916> >.

LUCY, M. The bovine dominant ovarian follicle. **Journal of animal science**, v. 85, n. 13_suppl, p. E89-E99, 2007. ISSN 1525-3163.

MIHM, M. et al. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1328-37, Dec 1997. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408237> >.

MONNIAUX, D. et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 51, p. 3-23, 1997. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9404267> >.

MONTEIRO, F. M. et al. Influence of superovulatory protocols on in vitro production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 5, p. 860-4, Oct 2010. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366429> >.

MONTEIRO, F. M. et al. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. **Anim Reprod Sci**, v. 110, n. 1-2, p. 128-38, Jan 2009. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313240> >.

NASSER, L. F. et al. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 4, p. 713-24, Oct 1993. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727353> >.

OLIVEIRA, L. H. et al. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro embryo production in Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 99, n. 11, p. 9307-9312, Nov 2016. ISSN 1525-3198 (Electronic)

0022-0302 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27568054> >.

PONTES, J. H. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-6, Jun 2011. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334055> >.

PONTES, J. H. et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-55, Nov 2010. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708245> >.

RAO, M.; RICHARDS, J.; MIDGLEY, A. Hormonal regulation of cell proliferation in the ovary. **Cell**, v. 14, p. 71-78, 1978.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. **J Reprod Fertil**, v. 110, n. 2, p. 279-89, Jul 1997. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9306982>>.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589-595, 2002. ISSN 0006-3363.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002. ISSN 1040-452X (Print)

1040-452X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560>>.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**, v. 24, p. 77, 1983. ISSN 0067-7833.

SALILEW-WONDIM, D. et al. Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0140467, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536655>>.

SANANMUANG, T. et al. Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1708-19, Jun 2011. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396699>>.

SANCHES, B. V. et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-51, Apr 1 2016. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739533>>.

SANTOS FILHO, A. et al. Ovarian follicular dynamics of five-eighths Girolando cows. **Reprod Domest Anim**, v. 36, n. 3-4, p. 207-10, Aug 2001. ISSN 0936-6768 (Print)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555371> >.

SAUMANDE, J. Folliculogenesis in ruminants. **Recueil de Medecine Veterinaire (France)**, 1991. ISSN 0034-1843.

SCARAMUZZI, R. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, fertility and development**, v. 5, n. 5, p. 459-478, 1993. ISSN 1448-5990.

SEIDEL, G. E., JR. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228-35, Jan 7 2006. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263160> >.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred Bos indicus and Bos taurus cows. **Anim Reprod Sci**, v. 151, n. 3-4, p. 119-25, Dec 30 2014. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465899> >.

SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v. 12, n. 2, p. 105-117, 2002.

SIMPSON, R. et al. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 2, p. 483-492, 1994. ISSN 1470-1626.

SOUZA, C. J.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **J Reprod Fertil**, v. 108, n. 1, p. 101-6, Sep 1996. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8958835> >.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reprod Domest Anim**, v. 52, n. 4, p. 561-569, Aug 2017. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28295710> >.

STEEL, R.; HASLER, J. 120 Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 182-183, 2003. ISSN 1448-5990.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 22, n. 4, p. 12-9, 2004.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.; BECKERS, J.-F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997. ISSN 0093-691X.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-51, Apr 01 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114> >.

VIANA, J. H. et al. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, n. 7, p. 966-72, Apr 15 2010. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071017> >.

VIEIRA, L. M. et al. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 877-886, Mar 15 2016. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26639640> >.

VIEIRA, L. M. et al. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 204-12, Jul 15 2014. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768006> >.

WANDJI, S. A.; FORTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biol Reprod**, v. 46, n. 6, p. 1034-41, Jun 1992. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1391301>>.

WRIGHT, J. Photomicrographic illustration of embryo codes (Appendix D). **Manual of the international Embryo Transfer Society (IETS). International Embryo Transfer Society, Inc., Savo, IL**, p. 175-178, 2000.

YOUNGS, C. R. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. **J Vis Exp**, n. 54, Aug 5 2011. ISSN 1940-087X (Electronic)

1940-087X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847080>>.