

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS ESTIMULADAS COM FSH OU ECG

OOCYTE RECOVERY AND *IN VITRO* PRODUCTION FROM COWS STIMULATED WITH EITHER FSH OR ECG

Ribeiro, L.V.P.^{1*}, Rigolon, L.P.¹, Cavaliere, F.L.B.², Seko M.B.², Martinez, A.C.¹, Ribeiro, M.G.¹, Martins, R.R.¹, Ávila, M.R.¹ e De Conti, J.B.¹

¹Universidade Estadual de Maringá. Umuarama-Paraná. Brasil. *lvet20@hotmail.com

²Centro Universitário de Maringá. Maringá-Paraná. Brasil.

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

OPU. FIV. Reprodução animal.

ADDITIONAL KEYWORDS

OPU. FIV. Animal reproduction.

RESUMO

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

submetidos a fertilização *in vitro* para produção de embriões.

SUMMARY

It was evaluated the oocyte and embryo *in vitro* production of 42 Nelore mixed breed cows (*Bos taurus indicus*) come from de same genetic group, aging from 4 to 9 years, with mean body weight of 420 kg, stimulated with FSH and eCG. The animals were distributed into three groups: group 1, control (n= 14), only with follicular aspiration (OPU); group 2, treated with 1400 UI of eCG in a single dose plus OPU (n= 14); and group 3, treated with 120 UI of FSH administered four times plus OPU with 12 h of interval (n= 14). All groups received auricular implant with 3 mg of Norgestomet on the first day (D0) associated with 2 mg of estradiol benzoate intramuscularly. At the seventh day (D7) the implants were removed and the ovarian aspirations were realized on the cows of group 1(OPU). Group 2 had the eCG applied at the fifth day and the OPU was performed at D7. The animals from group 3 were treated with FSH at fifth and sixth day and the aspiration occurred at D7 (OPU). The follicular aspiration procedure was done via transvaginal guided with ultrasound. It was performed 42 aspirations obtaining 627 oocytes, where 502 were viable and 125 non-viable. Then, it was realized the *in vitro* maturation and fecundation. The cleavage, blastocyst and eclosion rate were evaluated. There were no

significant difference ($p > 0.05$) at these parameters between the groups. In conclusion, the gonadotrophic stimulation with FSH and eCG, at the doses used in this study, was insufficient to increase the quality of the viable oocytes submitted to *in vitro* fertilization to produce embryos.

INTRODUÇÃO

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

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

Entre as técnicas utilizadas para a coleta de oócitos, a aspiração transvaginal guiada por ultrassom é a que apresenta maior número de embriões produzidos *in vitro* por doadoras devido a alta repetibilidade, possibilitando maior recuperação de oócitos (Pieterse *et al.*, 1988).

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

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

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

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

MATERIALE MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

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

Foram utilizadas 42 fêmeas Nelore

mestiças, proveniente de um mesmo grupo genético, com idade de 4 a 9 anos, com peso médio de 420 kg. Estas fêmeas foram everminadas com Ivermectina 1% (Ivomec, Merial®) e passaram por um período de adaptação de 45 dias, permaneceram em pastagem de *Cynodon* spp. (grama estrela)

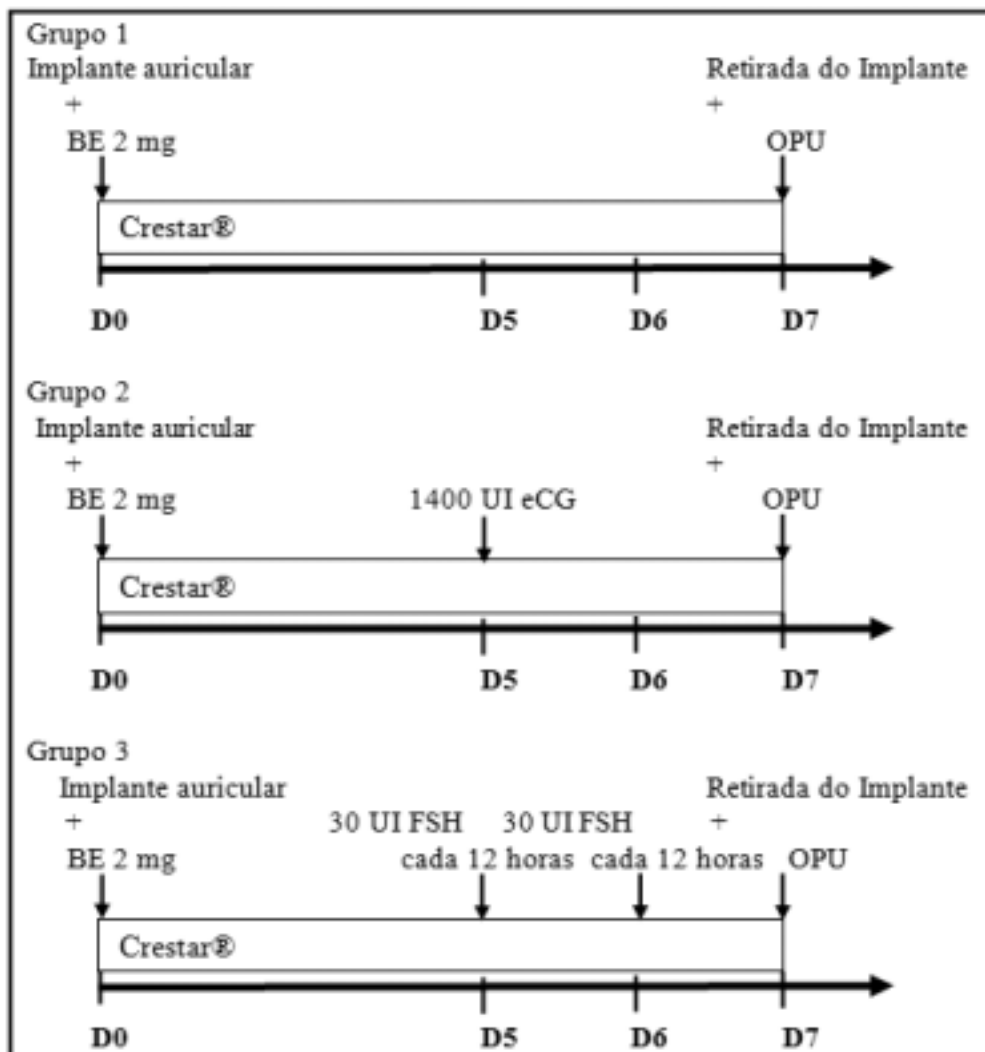


Figura 1. Diagrama esquemático dos protocolos de estimulação e sincronização de ondas foliculares de vacas Nelore mestiças de 4 a 9 anos de idade. (Diagram of follicular wave stimulation and synchronization in 4 to 9-year-old crossbred Nelore cows).

e tiveram acesso à água e sal mineral *ad libitum*.

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

As fêmeas foram separadas aleatoriamente, em três grupos de 14 animais: grupo 1: controle, não receberam tratamento estimulatório, apenas OPU em D7; grupo 2: estimulação com 1400 UI de gonodotrofina coriônica equina (eCG), (Folligon®, Intervet), via intramuscular, em D5 e OPU em D7; e grupo 3: estimulação com 120 UI de hormônio folículo estimulante (FSH) (Pluset®, I.F. Serono, Roma, Itália), administrados via intramuscular em 4 aplicações com 12 horas de intervalo (30 UI), iniciando a partir do quinto dia da colocação do implante auricular, seguida de OPU em D7.

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

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

Para inibir os movimentos peristálticos e desconforto ao animal foi feita uma anestesia epidural sacrococcígea, utilizando-se 100 mg de lidocaína a 2% (Anestésico Pearson®) e, em seguida, o transdutor foi inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram

posicionados para obtenção de uma boa visualização dos folículos na tela do ultrassom.

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

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

No laboratório os oócitos foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/ml piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg de FSH/ml, 50 µg de LH/ml e 1 µg de estradiol/ml, mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar com máxima

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

umidade, durante 22-24 horas. Durante esse período os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) permaneceram em microgotas de 100 µl de meio de maturação coberta por óleo mineral.

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em 100 µl de meio TALP-FIV suplementado com 10 µg/ml de heparina, 22 µl/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen utilizado foi de uma mesma partida de um touro da raça Nelore, descongelado em banho-maria a 35°C. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizado centrifugação em gradiente percoll 90% e 45%, a 1200 rotações por minuto, durante 20 minutos. Foi utilizada a concentração de 2 x 10⁶ espermatozoides/ml e estes foram transferidos para microgotas com 20 oócitos/gota juntamente com COCs, onde permaneceram por 18 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após a fecundação, os zigotos foram cultivados *in vitro* no meio SOF suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 18 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera

gasosa contendo 5% de CO₂, em ar com máxima umidade. Decorridas 48 horas, foi avaliada a taxa de clivagem e feito a renovação do meio de cultivo. Sete dias após a fecundação foram realizadas as avaliações dos embriões de cada grupo, classificando-os em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido ou blastocisto eclodido, conforme classificação recomendada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a recuperação de oócitos dos animais dos três tratamentos foram realizadas 42 aspirações foliculares (OPU) em que foram obtidos 627 oócitos, sendo 502 viáveis e 125 inviáveis.

Na **tabela I**, estão descritos os resultados da aplicação do eCG ou do FSH sobre a qualidade dos oócitos viáveis.

Observou-se que não houve efeito ($p>0,05$), dos tratamentos com eCG ou FSH

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

	Controle	Tratamentos ¹ ECG (1400 UI)	FSH (120 UI)
Oócitos viáveis	10,50±11,56	16,38±15,21	10,35±7,27
Oócitos qualidade 1	2,00±3,96	5,46±9,00	3,00±3,74
Oócitos qualidade 2	1,07±1,59	2,00±4,16	2,07±2,05
Oócitos qualidade 3	5,71±8,58	5,15±4,91	2,00±2,07
Oócitos expandidos	1,71±2,26	3,77±3,58	3,07±4,68

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

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

	Controle	Tratamentos ¹	
		ECG (1400 UI)	FSH (120 UI)
Oócitos inviáveis	2,57±5,54	2,38±3,50	1,21±3,11
Oócitos atrésicos	1,71±4,74	4,61±6,45	1,00±2,66
Oócitos degenerado	0,85±1,40	0,30±0,63	0,14±0,53
Oócitos desnudo	0,21±0,58	0,38±0,76	0,07±0,26

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

no número de oócitos viáveis com relação ao grupo controle. O número de oócitos viáveis é de importância fundamental em programas de fertilização *in vitro* (FIV). O fato de não haver diferença significativa entre as quantidades de oócitos morfológicamente viáveis, pode indicar que a sincronização da onda folicular permitiu que todos os oócitos estivessem na mesma fase fisiológica, não havendo diferença entre os estimulados ou não.

Na **tabela II**, estão expressos os resultados da aplicação do eCG ou do FSH sobre a produção de oócitos inviáveis de vacas Nelore mestiças.

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

Sendag *et al.* (2008) encontraram melhores resultados utilizando 500 UI de FSH comparando com a aplicação de 3000UI de

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

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Rouillier *et al.* (1996); Goodhand *et al.* (1999); Roover *et al.* (2005) comentam que o tratamento com FSH supera os resultados obtidos nos tratamentos como eCG, sendo para estes autores o método de escolha para superovulação de bovinos. Na maioria dos estudos comparando os dois procedimentos, o tratamento com FSH resultou em leve aumento de número de embriões utilizáveis.

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

Na **tabela III**, está descrito os resultados médios da aplicação do eCG ou do FSH sobre a produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos aspirados de vacas Nelore mestiças.

Ramos *et al.* (2006) avaliaram os efeitos

de dois protocolos de punção folicular na quantidade/qualidade dos oócitos e na produção de embriões *in vitro*, em vacas da raça Gir, não lactantes, sendo um grupo sem estimulação hormonal e outro com aplicação de 250 UI de FSH em doses decrescentes. Encontraram taxa de clivagem de 56% e de blastocisto de 18%, tendo a pré-estimulação ovariana melhorado a qualidade e a taxa de clivagem dos oócitos recuperados por punção folicular. Goodhand *et al.* (1996) verificaram que o FSH em doses múltiplas e aspiração de animais estimulados uma vez por semana têm sido mais eficientes que uma só administração. Entretanto Monteiro *et al.* (2009) utilizaram vacas controle, pré-estimuladas com FSH e OPU 6 horas após e, pré-estimuladas com FSH e OPU 48 horas após, não tendo ocorrido qualquer diferença. As taxas de clivagem e de blastocisto foram semelhantes entre os três tratamentos, sendo 77,4% e 42,70%, 75,54% e 31,65%, 63,52% e 33,33%, respectivamente, contudo a taxa de blastocistos eclodidos foi superior nos controles (30,27%) em relação aos demais. No trabalho em questão obteve-se resultado semelhante comparando o grupo controle (sem estimulação) e o grupo 3 (tratado com FSH), já que as taxas de clivagem, de blastocisto e de eclosão de todos os grupos foram semelhantes. Satrapa *et al.* (2005)

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

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

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

notaram que a superestimulação ovariana com OPU 48 horas após a última aplicação de FSH não aumentou a produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Nelore, além de as maiores taxas de blastocisto eclodido foram observadas em oócitos provenientes de vacas que não foram superestimuladas. Já, Nonato *et al.* (2005) observaram que a administração prévia de FSH na aspiração folicular não aumentou a média de oócitos obtidos, porém, aumentou a taxa de produção embrionária, o que é benéfico para a tecnologia de produção de embriões *in vitro*, discordando dos resultados encontrados no trabalho aqui desenvolvido.

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

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

No presente trabalho foi observada elevada variação na quantidade de oócitos, sendo que no controle foi de 1 a 43, nos pré-

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

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

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

CONCLUSÕES

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

BIBLIOGRAFIA

- Abdul, S.S., Hutchinson, J.S.M., Broadbent, P.J. and Dolman, D.F. 1989. Hormonal profiles in superovulated Hereford x British Friesian heifers. *Theriogenology*, 31: 253.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martínez, M., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 139-204.
- Boland, M.P., Goulding, D. and Roche, J.F. 1991. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35: 5-17.
- Brogliatti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45: 1163.
- Chaubal, S.A., Ferre, L.B., Molina, J.A., Faber, D.C., Bols, P.E.J., Rezamand, P., Tian, X. and Yang, X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, 67: 719-728.
- Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R. e Freitas, V.J.F. 2001. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Varela Editora e Livraria Ltda. São Paulo. pp. 195-226.
- Goodhand, K.L., Watt, R.G., Staines, M.E., Hutchinson, J.S. and Broadbent, P.J. 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

- production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, 51: 951-961.
- Goodhand, K.L., Broadbent, P.J., Hutchinson, R. and Watt, G. 1996. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. *Theriogenology*, 45: 355.
- Kozicki, L.E., Segui, M.S., Fantini Filho, J.C., Prado, F.R.A., Matté, F., Glaser, J.R.P. e Weiss, R.R. 2005. A somatotrofina bovina (BST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. *Arch. Vet. Sci.*, 10: 35-44.
- Madureira, E.H e Baruselli, P.S. 2000. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. Em: Bó, G.A., G.P. Adams e R.J. Mapletoft. Dinâmica folicular ovárica em bovino. Funvet. São Paulo. pp. 12-34.
- Merton, J.S., De Roos, A.P.W., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L.A.M. and Dieleman, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-667.
- Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J. 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, 19: 55-81.
- Monteiro, F.M, Ferreira, M.M.G., Potiens, J.R., Eberhardt, B.G., Trinca, L.A. and Barros, C.M. 2009. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 44. http://www3.interscience.wiley.com/journal/122299747/abstract#relatedArticles_01/05/09.
- Nonato Jr., I., Pontes, J.H.F., Ereno Jr., J.C., Sanches, B.V. e Seneda, M.M. 2005. Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Nelores (*Bos taurus indicus*) tratadas com FSH previamente à aspiração. *Acta Sci. Vet.*, 33: 369.
- Pieterse, M.C. and Kappen, K.A. 1992. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 762.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, A.M. and Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-756.
- Ramos, A.A., Ferreira, A.M., Sá, W.F., Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M. e Henry, M.R.J.M. 2006. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58: 341-347.
- Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P. and Dessy, F. 2005. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim. Reprod. Sci.*, 86: 13-25.
- Roover, R., Feugang, J.M., Bols, P.E., Genicot, G. and Hanzen, C.H. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryoproduction. *Reprod. Dom. Anim.*, 43: 239-245.
- Rouillier, P., Guilbault, L.A., Lussier, J.G. and Matton, P. 1996. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology*, 46: 1053-1061.
- Sendag, S, Cetin, Y., Alan, M., Hadelér, K. and Niemann, H. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 208-214.
- Satrapa, R.A., Ferreira, M.M.G., Monteiro, F.M., Ederhardt, B.G., Melo, D.S., Potiens, J.R. e Barros, C.M. 2005. Influência de protocolos de super-estimulação e privação hormonal na produção *in vitro* de embriões Nelore (*Bos taurus indicus*). *Acta Sci. Vet.*, 33: 404-404.
- Stubbings, R.B. and Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43: 705-712.
- Wang, H., Wu, M., Patt, D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. 1988. Superovulation in beef heifers with PMSG: effect of dose and monoclonal antibodies to PMSG. *Theriogenology*, 29: 322.