



GISVANI LOPES DE VASCONCELOS

**RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE OOCITÁRIA, PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES E CARACTERÍSTICAS DE
FERTILIDADE EM VACAS BRAHMAN E SIMENTAL**

**LAVRAS-MG
2017**

GISVANI LOPES DE VASCONCELOS

**RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE OOCITÁRIA, PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES E CARACTERÍSTICAS DE FERTILIDADE EM VACAS BRAHMAN E
SIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

de Vasconcelos, Gisvani Lopes.

Relação entre qualidade oocitária, produção *in vitro* de
embriões e características de fertilidade em vacas Brahman e
Simental / Gisvani Lopes de Vasconcelos. - 2017.

151 p. : il.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

0

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Contagem folicular antral. 2. Largura vulvar. 3. Tamanho
ovariano. I. de Souza, José Camisão . . II. Título.

GISVANI LOPES DE VASCONCELOS

**RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE OOCITÁRIA, PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES E CARACTERÍSTICAS DE FERTILIDADE EM VACAS BRAHMAN E
SIMENTAL**

**RELATION BETWEEN OOCYTE QUALITY, *VITRO* EMBRYO PRODUCTION
AND FERTILITY CHARACTERISTICS IN BRAHMAN AND SIMMENTAL COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 20 de novembro de 2017.

Dra. Beatriz Cordenonsi Lopes	EPAMIG
Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira	EPAMIG
Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles	UFLA

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

À Deus por sua infinita bondade

À minha mãe e meu pai, pelo apoio nas minhas decisões

Às minhas irmãs pelo incentivo

Ao meu namorado, pelas orações e companheirismo

Com amor

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Por ser quem sou e por tudo que superei na vida, eu te agradeço, meu Deus! É o meu alicerce, minha direção e meu guia.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fazenda Casa Branca Agropastoril, no nome do Heitor Pinheiro, pela cooperação e pelo aceite na realização da produção *in vitro* de embriões bovinos no laboratório de fertilização *in vitro*.

À Universidade Federal do Ceará – UFC em Sobral-CE, no nome do prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela colaboração na realização da técnica de microscopia de fluorescência.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ em Recife-PE, no nome da profa. Dra. Christina Peixoto e Dra. Mariana Donato pela colaboração na realização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao professor José Camisão de Souza, pela orientação, paciência e disposição para ajudar.

Aos membros da banca de doutorado pela solicitude em contribuir no engrandecimento deste trabalho.

Aos meus pais, José Orion de Vasconcelos e Vicência Maria Lopes pelo amor e apoio incondicional, em todas as minhas decisões nas diferentes etapas da minha vida.

Às minhas irmãs queridas: Gisleni de Vasconcelos, Giseli de Vasconcelos, Germânia de Vasconcelos, Lidiane de Vasconcelos, Viviane de Vasconcelos e Christiane de Vasconcelos pela força e incentivo.

Ao meu anjo da guarda e namorado, Janvion Andrade, pelo companheirismo, amor, apoio em todos os momentos e singular torcida. “Se você me pedir pra ficar pra sempre com você, nem vou pensar duas vezes pra te responder, 'Cê sabe que eu vou, vou, vou, pego minhas coisas e vou, ficar pra sempre, sempre com você”.

Aos meus sobrinhos Vicência Vívian de Vasconcelos, Dário Willian de Vasconcelos, Cecília de Vasconcelos e a minha afilhada Clarice de Vasconcelos, pela docura e amor.

Às minhas amigas Helenas: Cinara Vasconcelos, Silvany Santos e Maria Augusta Albuquerque pelos longos anos de amizade.

Aos meus amigos de Sobral, Anderson Weiny, Laís Feitosa e a minha queridíssima Ellen Vasconcelos pela ajuda nos experimentos e pela parceria de sempre.

[...] A todos funcionários do DZO/UFLA.

A todos os colegas de departamento, em especial minha amiga e afilhada Renata Maculan, pela receptividade, amizade e colaboração.

A meus amigos que Lavras me presenteou, Jesus Sanchez, Gabriel Miranda, Nathalia Alves, Cintia Vanin, Ana Lécia Aparecida, Camila Alves, Luciana França por terem aberto as portas do coração para mim.

MUITO OBRIGADA!

*“Por isso não tema, pois estou com você;
não tenha medo, pois sou o seu Deus.
Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei
com a minha mão direita vitoriosa.”
(Isaías 41:10)*

RESUMO

As relações entre contagem folicular antral (CFA), população folicular pré-antral, raça (Brahman e Simental), morfometria da genitália, progressão meiótica e contagem de células embrionárias em vacas foram analisadas. Classes de contagem folicular antral (alta: ≥ 50 ; intermediária: 30-49 e baixa: < 30) e volume ovariano (VO) grande $> 11 \text{ mm}^3$, média: > 8 e $\leq 11 \text{ mm}^3$ e pequena: $\leq 8 \text{ mm}^3$) foram usadas para ovários de abatedouro com predominância *Bos indicus*. CFA e classe de largura vulvar (LV) foram definidas separadamente para Brahman e Simental. CFA alta (≥ 50 e ≥ 25), intermediária (30-49 e 16-24) e baixa (< 30 e ≤ 15); LV grande ($> 123 \text{ mm}$ e 80 mm), média ($> 102 \text{ mm}$ e $\leq 123 \text{ mm}$; $> 65 \text{ mm}$ e $\leq 80 \text{ mm}$) e pequena ($\leq 102 \text{ mm}$ e $\leq 65 \text{ mm}$) para Brahman e Simental. Os dados foram analisados usando procedimentos (REG, GLM e GLIMMIX) do SAS® (SAS, Cary, NC- EUA). Houve correlação positiva ($P < 0,05$) entre CFA e o número de folículos primordiais ($r = 0,90$) e secundários normais ($r = 0,53$). Os números de oócitos grau I, II e viáveis foram maiores na classe de CFA alta ($7,86 \pm 0,6$; $4,02 \pm 0,39$ e $16,26 \pm 1,11$, respectivamente) comparada a intermediária ($4,85 \pm 0,67$; $2,76 \pm 0,43$ e $13,05 \pm 1,23$) e baixa ($3,27 \pm 0,73$; $1,24 \pm 0,47$ e $8,07 \pm 1,34$, respectivamente). A média de CFA total foi maior ($P < 0,05$) na classe VO grande ($58,50 \pm 3,94$) comparada às classes média ($45,39 \pm 4,0$) e pequena ($31,62 \pm 3,94$). As médias de oócitos grau I e viáveis foram maiores ($P < 0,05$) na VO grande ($6,69 \pm 0,72$ e $16,12 \pm 1,29$) e média ($6,22 \pm 0,74$ e $15,03 \pm 1,31$) comparada à pequena ($3,72 \pm 0,72$ e $9,37 \pm 1,29$). Vacas Brahman tiveram maior ($P < 0,05$) CFA ($41,46 \pm 2,53$ versus $23,27 \pm 3,19$) e LV ($109,41 \pm 1,01 \text{ mm}$ versus $72,29 \pm 1,01 \text{ mm}$) que vacas Simental. A CFA na classe LV grande ($44,29 \pm 0,87$) foi superior ($P < 0,001$) comparada às demais classes de LV (média: $35,86 \pm 0,75$ e pequena: $27,46 \pm 0,69$). O número de oócitos viáveis ($17,23 \pm 0,41$ e $12,15 \pm 0,46$), total de embriões ($6,89 \pm 0,26$ e $2,50 \pm 0,21$), eficiência de produção de embriões ($38,37 \pm 0,62$ e $22,43 \pm 0,62$), taxa de prenhez ($38,40 \pm 0,83$ e $29,67 \pm 0,91$) e a eficiência de oócitos viáveis em relação à prenhez ($12,61 \pm 0,48$ e $8,84 \pm 0,52$) foram maiores ($P < 0,05$) na raça Brahman comparada à Simental. A proporção de oócitos em metáfase II na classe CFA alta (81,20%) foi superior ($P < 0,0001$) comparada às classes de CFA intermediária (62,50%) e baixa (41,51%). A proporção de oócitos em metáfase I, telófase I e anáfase I na classe de CFA intermediária (26,04%) foi superior ($P < 0,05$) às classes de CFA alta (8,55%) e baixa (14,15%). O percentual de oócitos em quebra da vesícula germinativa na classe de CFA baixa (32,08%) foi maior ($P < 0,0001$) que às classes de CFA alta (5,98%) e intermediária (8,33%). O número médio de embriões na classe de CFA alta ($188,37 \pm 1,320$) foi superior ($P < 0,0001$) comparado às classes de CFA intermediária ($137,97 \pm 1,32$) e baixa ($110,33 \pm 1,32$). Conclui-se que a contagem folicular antral, volume ovariano e largura vulvar são características que podem prever oócitos recuperados, progressão meiótica, produção *in vitro* de embriões e contagem de células embrionárias, dentro das condições experimentais presentes e podem ser consideradas em programas de seleção de fertilidade.

Palavras-chave: Contagem folicular antral. Largura vulvar. Tamanho ovariano. Fertilidade reprodutiva. Seleção genética.

ABSTRACT

The possible links between antral follicle count (AFC), pre-antral follicle population, breed (Brahman and Simmental), genitalia morphometrics, meiotic progression and embryonic cell count in cows were analyzed. Antral follicle count classes (high: ≥ 50 ; intermediate: 30–49 and low: < 30) and ovarian volume (OV) large: $> 11 \text{ mm}^3$; intermediate: > 8 and $\leq 11 \text{ mm}^3$ and small: $\leq 8 \text{ mm}^3$) were established for analysis. AFC and vulva width (VW) classes were defined separately for Brahman and Simmental cows, respectively as follows; AFC: high (≥ 50 and ≥ 25), intermediate (30–49 and 16–24) and low (< 30 e ≤ 15); VW: large ($> 123 \text{ mm}$ and 80 mm), intermediate ($> 102 \text{ mm}$ and $\leq 123 \text{ mm}$; $> 65 \text{ mm}$ and $\leq 80 \text{ mm}$) and small ($\leq 102 \text{ mm}$ e $\leq 65 \text{ mm}$). Data were analyzed using procedures (REG, GLM and GLIMMIX) from SAS® (SAS, Cary, NC- USA). There was a positive correlation ($P < 0.05$) between AFC and the number of normal primordial ($r = 0.90$) and secondary ($r = 0.53$) follicles. Grade I, II and viable oocyte numbers were higher in the high AFC class (7.86 ± 0.6 , 4.02 ± 0.39 and 16.26 , respectively) compared to the intermediate (4.85 ± 0.67 , 2.76 ± 0.43 and 13.05 ± 1.23 , respectively) and low (classes (3.27 ± 0.73 , 1.24 ± 0.47 and 8.07 ± 1.34 , respectively). Mean total AFC was higher ($P < 0.05$) in the large OV class (58.50 ± 3.94) compared to the intermediate (45.39 ± 4.0) and small (31.62 ± 3.94) OV classes. Grade I and viable oocyte means were higher ($P < 0.05$) in the large OV class (6.69 ± 0.72 and 16.12 ± 1.29) and intermediate (6.22 ± 0.74 e 15.03 ± 1.31) compared to the small (3.72 ± 0.72 and 9.37 ± 1.29). Brahman cows had higher ($P < 0.05$) AFC (41.46 ± 2.53 versus 23.27 ± 3.19) and VW ($109.41 \pm 1.01 \text{ mm}$ versus $72.29 \pm 1.01 \text{ mm}$) than Simmental cows. The AFC in the large VW class (44.29 ± 0.87) was superior ($P < 0.001$) compared to the remaining VW classes (intermediate: 35.86 ± 0.75 and small: 27.46 ± 0.69). The number of viable oocytes (17.23 ± 0.41 and 12.15 ± 0.46), total embryos (6.89 ± 0.26 and 2.50 ± 0.21), embryo production efficiency (38.37 ± 0.62 and 22.43 ± 0.62), pregnancy rate ($38.40 \pm 0.83\%$ and $29.67 \pm 0.91\%$) and the efficiency of viable oocyte in relation to pregnancy ($12.61 \pm 0.48\%$ and $8.84 \pm 0.52\%$) were higher ($P < 0.05$) in the Brahman compared to the Simmental breed. The proportion of oocytes in metaphase II in the high AFC class (81.20%) was superior ($P < 0.0001$) compared to the intermediate (62.5%) and low (41.51%) AFC classes. The proportion of metaphase I, telophase I and anaphase I oocytes in the intermediate AFC class (26.04%) was superior ($P < 0.05$) in than in the high (8.55%) and low (14.15%) AFC classes. The percentage of germinal vesicle break down oocytes in the low AFC class (32.08%) was higher ($P < 0.0001$) than in the high (5.98%) and intermediate (8.33%) AFC classes. Mean embryo number in the high AFC class (188.37 ± 1.3) was superior ($P < 0.0001$) compared to the intermediate (137.97 ± 1.3) and low (110.33 ± 1.3) AFC classes. It is concluded that antral follicle count, ovarian volume and vulva width are characteristics that may predict oocyte recovery, meiotic progression, *in vitro* embryo production and embryonic cell count, within the present experimental conditions and perhaps be considered in fertility selection programs.

Keywords: Antral follicular count. Vulvar width. Ovarian size. Reproductive fertility. Genetic selection.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Classificação de oócitos segundo Stringfellow e Givens (2010). A (Grau I), B (Grau II), C (Grau III) e D (Grau IV).....	45
Figura 2	Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscópio de epifluorescência. A) Oócitos em VG: cromossomos descondensados; B) Oócitos em metáfase I: cromossomos altamente condensados. C) Oócitos em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e primeiro corpúsculo polar (1° CP).....	54
Figura 3	Esquema de desenvolvimento embrionário.....	59
Figura 4	Coloração com Hoechst 33342 para avaliação do número de células embrionárias (A) embrião com ± 110 células (B) embrião com ± 360 células.....	62

SEGUNDA PARTE- ARTIGO 01

Figura 1	Secções histológicas de folículos pré-antrais normais e degenerados nas classes de alta (A, B), intermediária (C, D) e baixa (E, F) contagem folicular antral (CFA). Folículo (s) (A) secundário normal e (B) primordiais e primários degenerados na classe de alta CFA; (C) primordial normal e (D) primários degenerados na classe de intermediária CFA; (E) primário normal e (F) primários degenerados na classe de baixa CFA. Nu : núcleo do oócito; O : oócito; CG : células da granulosa; OR : oócito retraído; CGD : células da granulosa desorganizadas.....	99
Figura 2	Número médio de folículos primordiais, primários e secundários normais e degenerados nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA). Letras maiúsculas indicam diferenças entre folículos normais e as minúsculas entre folículos degenerados ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.....	101
Figura 3	Fotomicrografia de oócitos bovinos em diferentes estágios de maturação nuclear nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA) avaliados sob microscópio de fluorescência. Oócito em A) Vesícula germinativa (VG) e B) Quebra de vesícula germinativa (QVG) na classe de baixa CFA; C) Metáfase I (MI) e D) Telófase I (TI) na classe de intermediária CFA E) Metáfase II (MII) na classe de alta CFA. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 568 nm. Aumento 200X.....	105
Figura 4	Micrografia representativa de complexos cumulus oócito (CCOs) nas classes de baixa, intermediária e alta contagem folicular antral (CFA). ZP : zona pelúcida; Nu : núcleo; m : mitocôndria; g : complexo de Golgi; m : mitocôndrias; r : retículo endoplasmático rugoso.....	108

SEGUNDA PARTE - ARTIGO 02

Figura 1	Largura vulvar medida com paquímetro digital.....	120
Figura 2	Efeito da interação entre raça (Brahman e Simental) e classe de contagem folicular antral (CFA Alta, Intermediária e baixa; A-F) sobre número de oócitos viáveis (OV), total de embriões (TE), porcentagem de eficiência de embriões (%EPE), número de prenhez (P), taxa de prenhez (%P), porcentagem da eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez (%OV/P). Letras maiúsculas entre as classes de CFA na raça Brahman e letras minúsculas entre as classes na raça Simental indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.....	128

Figura 3	Efeito da interação entre raça (Brahman e Simental) e classe de largura vulvar (Grande, média e pequena- A-F) sobre número de oócitos viáveis (OV), total de embriões (TE), porcentagem de eficiência de embriões (%EPE), número de prenhez (P), taxa de prenhez (%P), porcentagem da eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez (%OV/P). Letras maiúsculas entre as classes de CFA na raça Brahman e letras minúsculas entre as classes na raça Simental indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.....	129
Figura 4	Fotomicrografia de embriões bovinos para avaliação do número de células (blastômeros) sob microscópio de fluorescência. A-D) Embrião com \pm 180 células nas classes de alta contagem folicular antral (CFA); B-E) Embrião com \pm 130 células na classe de média CFA e C-F) Embrião com \pm 110 células na classe de baixa CFA. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 568 nm. Aumento 200X.....	131

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 01

Tabela 1	Coeficiente de correlações entre contagem folicular antral (CFA) e as categorias foliculares normais, degenerados e total.....	102
Tabela 2	Efeito da classe de contagem folicular antral (CFA) sobre características reprodutivas.....	103
Tabela 3	Efeito da classe de volume ovariano (VO) sobre as características reprodutivas.....	104
Tabela 4	Porcentagem (%) de oócitos em estágios de vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (QVG), fases intermediárias (Metáfase I, Anáfase I, Telófase I) e metáfase II nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA).....	106

SEGUNDA PARTE- ARTIGO 02

Tabela 1	Efeito da raça sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.....	125
Tabela 2	Efeito da contagem folicular antral (CFA) sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.....	125
Tabela 3	Efeito da classe de largura vulvar (LV) sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.....	126
Tabela 4	Número de blastômeros em embriões produzidos a partir de oócitos aspirados de vacas com alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA).....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

B.	Bos
vs.	Versus
et al.	E outros
E.P.M.	Erro padrão da média
I.M.	Intramuscular
S.D.	Desvio padrão da média

LISTA DE SIGLAS

17 α -OH	Enzima esteroidogênica 17 α -hidroxilase
AI	Anáfase I
Akt	Via da proteína quinase
AM	Acetoximetil
AMH	Hormônio Antimulleriano
AMPc	Via da adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina Trifosfato
AREG	Anfiregulina
BAK	Proteína-killer antagonista homóloga à Bcl-2
BAX	Proteína X associada as células B de linfoma 2
BCL-2	Linfoma de células B2
BE	Blastocisto expandido
BI	Blastocisto inicial
BID	Proteína BH3 semelhante à Bax
BIK	Proteína Killer que interage com Bcl-2
BL	Blastocisto
BLIMP-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BMP-2, -4, -7, -8b, -15	Proteína morfogenética óssea-2, -4, -7, -8b, -15
BSA	Albumina sérica bovina
c-kit	Receptor tyrosine kinase
CCOs	Complexo cumulus oócito
CFA	Contagem Folicular Antral
CIF	Características indicadoras de fertilidade
CIVE	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões
CGP	Células germinativas primordiais
CL	Corpo lúteo
CLV	Classe de largura vulvar
CP	Corpúsculo polar
COX -1, -2	Cicloxigenase -1, -2
CREB	Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc
CVO	Classe de volume ovariano
CYP11A	Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol pelo citocromo P450
CYP19A1	Enzima esteroidogênica do citocromo P19A1
DCKs	Quinase dependente de ciclina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2	Estradiol
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EOVQ/P	Eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez
EPE	Eficiência da produção de embriões <i>in vitro</i>
ESR -1, -2	Receptor do estrogênio -1 e -2
EthD-1	Etídio homodímero-1
FGF-2	Fator de Crescimento fibroblástico-2
FGFb	Fator de crescimento fibroblástico básico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais

FOXO3	Forkhead transcription fator
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação-9
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
HAS-2	Hialuronidase sintetase 2
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IMO	Inibidor da maturação oocitária
IDP	Intervalo de parto
IETS	International Embryo Technology Society
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina– 1
IGF-R1	Receptor do IGF do tipo 1
IL -1, -6	Interleucina -1, -6
KL	Kit ligante
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MBK-2	Proteína quinase ativada por mitógenos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MG	Minas Gerais
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator promotor de maturação
MSX1	Msh homeobox 1
mTORC1	Complexo 1 do Alvo da Rapamicina
N2	Nitrogênio
Nacl	Cloreto de sódio
NBLAST	Número médio de blastômeros
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
O2	Oxigênio
OCT-4	Octamer-binding transcription factor 4
OPU	Técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia
OV	Oócitos viáveis
P	Número de prenhez
p-FSH	FSH pituitário
PDGF	Fator derivado do desenvolvimento das plaquetas
P4	Progesterona
P450	Aromatase P450
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGE2	Prostaglandina E2
PHE	Penicilamina, hipotaurina, epinefrina
PI3K	Via fosfatidilinositol 3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
R-FSH	Receptor do hormônio folículo estimulante (FSH)
R-GH	Receptor do hormônio de crescimento (GH)

R-LH	Receptor do hormônio luteinizante (LH)
RNAm	Ácido ribonucleico
RNAsi	RNA interferente
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpS6	Proteína ribossomal S6
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
SOX-2	Sex determining region Y-box 2
STAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TALP	Tyrosina-albumina-lactato-piruvato
TBC1D1	Gene membro 1 da família do domínio TBC1
TCM-199	Tissue culture medium 199
TE	Tranferência de embriões
TE	Total de embriões
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
T1	Telófase 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TSC1	Proteína 1 de Esclerose Tuberosa
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UI	Unidade internacional
US	Ultrassonografia
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VG	Vesícula germinativa
ZP-1, -2, -3	Zona pelúcida -1, -2, -3

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior que
≥	Maior ou igual
<	Menor que
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
=	Igual
±	Maios ou menos
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Gauge
g	Gramma
h	Hora
kg	Quilograma
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
M	Molar
MHz	Megahertz
mL	Milititros
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetros de mercúrio
n	Número
ng	Nanograma
P	Probabilidade
pH	Ponte de hidrogênio
r	Coefficiente de correlação de Pearson

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	19
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Ovário mamífero.....	20
2.2	Oogênese.....	21
2.3	Foliculogênese.....	22
2.4	População e atresia folicular.....	23
2.5	Ativação e crescimento dos folículos primordiais.....	25
2.6	Crescimento de folículos pré-antrais (primários e secundários).....	26
2.7	Crescimento de folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios).....	28
2.8	Ovulação.....	30
2.9	Características indicadoras de fertilidade em fêmeas bovinas.....	31
2.9.1	Contagem folicular antral (CFA).....	31
2.9.2	Volume ovariano e morfometria da genitália externa.....	36
2.10	Fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i>.....	38
2.11	Técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (<i>Ovum pick up</i> - OPU).....	41
2.12	Método de obtenção de oócitos.....	43
2.13	Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	45
2.13.1	Histórico e evolução da biotécnica.....	45
2.13.2	Meios de cultivo para PIVE.....	46
2.14	Maturação oocitária.....	49
2.14.1	Maturação <i>in vivo</i>.....	50
2.14.2	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	51
2.14.2.1	Maturação molecular.....	52
2.14.2.2	Maturação nuclear.....	53
2.14.2.3	Maturação citoplasmática.....	55
2.15	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	57
2.15.1	Escolha do sêmen.....	58
2.16	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIVE)	58
2.17	Técnicas de avaliação da viabilidade e ultraestrutura de folículos, oócitos e embriões cultivados <i>in vitro</i>.....	61
2.17.1	Histologia Clássica.....	61
2.17.2	Microscopia de fluorescência.....	62
2.17.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	63
3	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	90
	ARTIGO 1 - Contagem folicular antral e volume ovariano como preditores do potencial de produção de oócitos em fêmeas bovinas.....	90
	ARTIGO 2 - Relação entre produção <i>in vitro</i> e características indicadoras de fertilidade em fêmeas <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i>.....	116

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A população ovariana é, em sua maior parte, constituída de folículos pré-antrais (aproximadamente 90%), que armazenam quase a totalidade dos oócitos presentes no ovário. Apesar dos milhares folículos presentes no ovário mamífero, a maioria deles (99,9%) não chegam à fase ovulatória, sendo eliminados por atresia. Esse processo resulta na diminuição drástica do número de oócitos que possivelmente ovulariam e que produziriam embriões viáveis (OTALA et al., 2002). Assim, biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), associadas à coleta de oócitos oriundos da punção folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* - OPU), têm sido utilizadas como estratégias para intensificar o potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos. Desta forma, é possível selecionar matrizes com alta qualidade genética, contribuindo para otimizar o melhoramento genético em curto período de tempo (VARAGO et al., 2008; HANSEN, 2014).

A produção de embriões na América do Sul corresponde a 72,7% da produção mundial, sendo o Brasil o maior produtor com 366.517 mil embriões produzidos, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014). A PIVE de fêmeas provenientes de rebanhos elites pode ser ainda mais eficaz quando associada à seleção de animais com características indicadoras de fertilidade (CIF) de fácil mensuração. Tais características tornam possíveis a predição do potencial fértil de uma fêmea e, conseqüentemente, o sucesso das biotécnicas aplicadas. Dentre as CIF encontram-se contagem folicular antral (CFA), volume ovariano e morfometria da genitália externa. A CFA tem sido utilizada como preditora quantitativa da reserva folicular ovariana (SILVA-SANTOS et al., 2014a). Sabe-se que a CFA é extremamente variável entre indivíduos tornando possível sua classificação como baixa, intermediária ou alta CFA (SANTOS et al., 2013). Apesar da grande variabilidade, a repetibilidade da população ovariana é alta, facilitando a seleção de fêmeas por avaliações realizadas durante determinado período (BURNS et al., 2005, IRELAND et al., 2009). Além disso, a CFA pode influenciar a eficiência da PIVE, podendo estar associada positivamente ao número médio de complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados e às taxas mais elevadas de blastocistos (IRELAND et al., 2008; SANTOS et al., 2016). A associação positiva entre CFA e índices reprodutivos tem sido amplamente relatada na literatura (MERCÉ et al., 2006; CHACUR et al., 2006; CUSHMAN et al., 2009; IRELAND et al., 2011; MESQUITA et al., 2016). O

tamanho ovariano é outra CIF que pode estar associado à CFA, indicando maior número de folículos e oócitos saudáveis (IRELAND et al., 2011; CUSHMAN et al., 2009).

Estudo recente demonstrou que a largura vulvar é preditora de reserva folicular ovariana em fêmeas bovinas (MESQUITA et al., 2016). Maior largura da vulva está associada positivamente à maior CFA, menor intervalo de partos e maior eficiência reprodutiva em fêmeas (MACULAN et al., 2015, dados não publicados). No entanto, a associação entre raça, CFA e estruturas do trato reprodutivo sobre as características reprodutivas e o efeito da CFA sobre a quantidade, viabilidade e ultraestrutura de oócitos/embriões produzidos *in vitro* ainda não foram estudados. Hipotetiza-se que CFA, volume ovariano, raça e largura vulvar estão relacionados com algumas características reprodutivas em fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, e que CFA alta proporciona maior progressão meiótica, maior número de células embrionárias PIVE e mantém a ultraestrutura de CCOs.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da CFA, classe de volume ovariano (VO), raça e classe de largura vulvar (LV) sobre algumas características reprodutivas, progressão meiótica, contagem celular de embriões produzidos *in vitro* e ultraestrutura de CCOs em fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Para melhor compreensão da relevância desse trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados aos ovários de mamíferos, oogênese e foliculogênese, população e atresia folicular, características indicadoras de fertilidade em fêmeas bovinas (CFA, volume ovariano e morfometria da genitália externa), fisiologia de fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*) e taurinas (*Bos taurus taurus*), técnica de OPU, PIVE, maturação oocitária, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* de embriões (CIVE) e técnicas de avaliação da viabilidade e ultraestrutura de folículos, oócitos e embriões cultivados *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovário mamífero

O ovário, principal órgão do sistema reprodutor feminino, é dividido em duas regiões distintas: a medular e a cortical. Além disso, externamente este órgão é circundado pela superfície epitelial denominada epitélio germinativo. Na maioria das espécies domésticas, exceto a equina, a região medular consiste na porção mais interna do ovário que é composta por tecido conjuntivo (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), nervos, artérias e veias,

responsáveis pela sustentação e nutrição deste órgão (SILVA, 2005). Já a região cortical, é considerada a porção funcional, sendo composta por células germinativas (oócitos) e somáticas (células da granulosa, da teca e do estroma), as quais formam os folículos (McGEE; HSUEH, 2000). Após a ovulação do folículo, é formado o corpo lúteo (CL), também presente no córtex que, assim como o folículo, possui vários estágios de desenvolvimento. O ovário exerce duas importantes funções fisiológicas: desenvolvimento e liberação de oócitos maduros (ovulação) aptos a serem fecundados (BARNETT et al., 2006) e síntese, secreção e produção de hormônios, fatores de crescimento e outros peptídeos essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade estral, além de manutenção do trato reprodutivo (HIRSHFIELD, 1991). Estas duas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese.

2.2 Oogênese

A formação dos folículos ovarianos, em mamíferos, ocorre ainda na vida fetal e engloba os processos de oogênese e foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). A oogênese compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até a formação do oócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). Em ruminantes, a oogênese inicia-se antes do nascimento, porém somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação.

Em animais de laboratório, as proteínas morfogenéticas ósseas BMP-4 e BMP-8b induzem a formação de CGPs na região do epiblasto do disco embrionário (YING; ZHAO, 2001). Em bovinos, as CGPs são oriundas da porção caudal do saco vitelínico do embrião (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994). As CGPs expressam várias proteínas, como por exemplo, OCT-4, SOX-2, Stella, Fragilis, E-Caderina e Blimp-1 e iniciam o processo de migração para o alantoide e mesoderma extra-embrionário (HAYASHI et al., 2007). Após perderem suas características de motilidade e sofrerem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as CGPs passam a se chamar oogônias (SADEU et al., 2006), as quais possuem alta atividade mitótica e transcricional (EPPIG et al., 2004). Essas divisões mitóticas que ocorrem no período pré-natal asseguram que a fêmea nascerá com um completo suprimento de células germinativas, as quais irão compor o futuro reservatório folicular.

Acredita-se que a migração das CGPs é orientada pelo contato entre o receptor c-kit, expresso na superfície destas células, e o seu ligante, o Kit ligante expresso nas células

somáticas que formam o substrato para a migração das CGPs para a crista gonadal (BUEHR et al., 1993). Ao entrarem na primeira divisão meiótica, as oogônias dão origem aos oócitos primários ou gametas femininos (PICTON et al., 1998). Esses oócitos ficam bloqueados na prófase I da meiose (em estágio de vesícula germinativa) até a puberdade (SUH et al., 2002).

Com o desenvolvimento das gônadas, uma camada de células somáticas achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (PICTON, 2001), dando início à foliculogênese. As células da pré-granulosa são originárias do mesonéfron ou de células mesoteliais oriundas do epitélio da superfície ovariana. Um estudo recente concluiu que as células da granulosa e as células epiteliais da superfície do ovário surgem a partir de um precursor comum, que seriam células do ápice gonadal semelhantes a células epiteliais (Gonadal Ridge Epithelial-Like – GREL; HUMMITZSCH et al., 2013).

2.3 Foliculogênese

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (WOOLUMS; PETER, 1994) que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994) e continua na vida reprodutiva até a senilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este processo está presente inclusive durante a prenhez (TAYLOR; RAJAMAHENDRAM, 1991) e no período pós-parto que precede a ciclicidade (McDOUGALL et al., 1995), e caracteriza-se por alterações morfológicas e funcionais do folículo (HUSSEIN, 2005).

Na região medular do ovário estão presentes vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, e na região cortical são encontrados folículos ovarianos contendo oócitos circundados por células somáticas (células da granulosa e células da teca) (FIGUEIREDO et al., 2008). Com o desenvolvimento, o folículo classifica-se em diferentes estágios sendo divididos em duas categorias: Folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) – (folículos primordiais, transição, primários e secundários) e folículos antrais (folículos terciários e pré-ovulatórios) (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os FOPAs caracterizam-se em um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas. O desenvolvimento folicular pré-antral inicia-se em torno de 90 a 140 dias de vida com a colonização do ovário fetal por células mesonéfricas, precursoras das células foliculares. Estas células somáticas achatadas circundam o oócito e formam uma camada de

células da pré-granulosa originando os folículos primordiais. A ativação dos folículos primordiais é um processo irreversível e contínuo que culminará no crescimento folicular ininterrupto até a ovulação ou atresia (PICTON, 2001). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular ovariana (WOOLUMS; PETER, 1994; FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos antrais ou cavitários são caracterizados pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, denominada antro folicular. O desenvolvimento dos folículos antrais na espécie bovina envolve o recrutamento de um grupo de folículos secundários avançados ou antrais iniciais para retomar o crescimento (fase de recrutamento). Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode ovular (fase de seleção). O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento desses últimos e inibe o recrutamento do novo grupo de folículos (fase de dominância) (GINTHER et al., 1996).

2.4 População e atresia folicular

A população folicular é bastante variável entre as espécies, com população estimada em 235.000 folículos em vacas, 160.000 em ovelhas, 37.000 em cabras e 2.000.000 em mulheres (BETTERIDGE et al., 1989; AMORIM et al., 2000; LUCCI et al., 1999; ERICKSON et al., 1986).

O “*pool*” de folículos pré-antrais existente nos ovários de mamíferos representa uma significativa reserva de folículos em estágio de quiescência ideais no processo de manipulação genética em espécies domésticas, bem como para a preservação de espécies em extinção e preservação da fertilidade (PICTON, 2001). Entretanto, a quantidade e a distribuição dos diferentes tipos foliculares nos ovários de animais são marcadas por uma grande variação individual, além de ser afetado pela raça, idade, níveis hormonais, genética, bem como o *status* reprodutivo e nutricional do animal (IRELAND et al., 2007).

A fertilidade das fêmeas é determinada, em grande parte, pela capacidade de desenvolvimento dos oócitos, refletindo assim, na sua capacidade de sofrer meiose, ser fertilizado e originar um embrião saudável (KIDDER, 2010). Entretanto, ao longo da vida das fêmeas, há uma significativa redução na população de folículos pré-antrais (SHAW et al., 2000) devido ao processo fisiológico degenerativo irreversível denominado atresia. Tal processo acomete cerca de 99,9% dos folículos ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2008) e reduz drasticamente o potencial reprodutivo das fêmeas. A atresia pode ocorrer por via degenerativa

(SAUMANDE, 1981) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995), quando o ambiente parácrino ou endócrino não é apropriado para suportar o crescimento e/ou diferenciação das células foliculares (SILVA et al., 2002).

A iniciação, execução e regulação da apoptose envolve vários fatores bioquímicos e a família de enzimas caspases desempenham um papel central na via de sinalização da apoptose. As caspases são membros da família conservada de proteases de cisteína com especificidade a aspartato. As caspases são expressas como pró-enzimas que sofrem processamento proteolítico para gerar a forma ativada após estímulo apoptótico. Existem 14 tipos de caspases identificados como caspase-1 à caspase-14 (TIBBETTS et al., 2003). Alguns membros da família atuam especificamente na morte celular por apoptose e são subdivididos em iniciador (caspases-2, -8, -9 e -10) e executor ou caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7; STRASSER et al., 2000). Caspases iniciadoras são clivadas em resposta a estímulos apoptóticos e ativam as caspases efetoras (GREEN, 2003). Durante a apoptose, as caspases efetoras clivam numerosas proteínas localizadas na membrana da célula, no núcleo e citoplasma (NAGASE et al., 2003). No sentido de evitar a morte celular por apoptose, existem processos de sobrevivência celular que promovem a transcrição de várias proteínas anti-apoptóticas, tais como alguns membros da família BCL-2. Tal família compreende tanto membros anti-apoptóticos, como o Linfoma de células B2 (BCL-2) e membros pró-apoptóticos, incluindo Proteína X associada as células B de linfoma 2 (BAX), Proteína BH3 semelhante à Bax (BID), Proteína-killer antagonista homóloga à Bcl-2 (BAK) e Proteína Killer que interage com Bcl-2 (BIK) (SHI et al., 2002).

Já se sabe que o desequilíbrio entre fatores pró e anti-apoptóticos são fatores determinantes na sobrevivência e desenvolvimento folicular (HSU; HSUEH, 2000). Portanto, apesar do expressivo contingente da população folicular ovariana, poucos são os oócitos ovulados e que potencialmente serão fecundados, caracterizando a gônada feminina como um órgão de baixo potencial reprodutivo.

Dessa forma, para se obter o sucesso no crescimento e desenvolvimento folicular, se faz necessário uma complexa interação entre oócito e células somáticas do estroma ovariano, envolvendo mensageiros celulares, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (ARAÚJO et al., 2014; PASSOS et al., 2016; SILVA et al., 2016). A interação harmônica entre estas substâncias é responsável pela saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência e posterior crescimento dos folículos até o estágio pré-ovulatório.

2.5 Ativação e crescimento dos folículos primordiais

Após sua formação, os folículos primordiais podem seguir três possíveis destinos, ou seja, (1) morrer por atresia, (2) permanecer no estágio primordial ou (3) iniciar a transição para a fase de crescimento (McGEE; HSUEH, 2000). O início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), sendo considerado o maior evento biológico que controla o potencial reprodutivo das fêmeas (McLAUGHLIN; MCIVER, 2009).

O início do crescimento de folículos primordiais, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da transição dos folículos do “*pool*” de reserva, ou folículos quiescentes, para o “*pool*” de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (RÜSSE, 1983). O primeiro sinal da ativação folicular é a retomada da proliferação das células da granulosa, com a mudança na morfologia dessas células, que passam de pavimentosas para cúbicas, bem como o crescimento oocitário (HIRSHFIELD, 1991). A manutenção da quiescência, a sobrevivência e a ativação dos folículos primordiais são reguladas por complexos mecanismos moleculares coordenados por eventos inibitórios e/ou estimulatórios que envolvem diferentes substâncias.

Vários trabalhos destacaram a atuação de uma série de substâncias que estimulam esse processo de ativação tais como: BMP-4 (KNIGHT; GLISTER, 2006), FSH (SILVA et al., 2004), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9; MARTINS et al., 2008), Fator de Crescimento fibroblástico-2 (FGF-2; MATOS et al., 2007), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF; BRUNO et al., 2009), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina- 1 (IGF-1; MARTINS et al., 2010), Fator de Crescimento Epidermal (EGF; SILVA et al., 2004), Ativina-A (SILVA et al., 2006), Estradiol (E2), Progesterona (P4; LIMA-VERDE et al., 2010), Proteína Morfogénicas Óssea -7 (BMP-7; ARAÚJO et al., 2010), entre outras. Outros estudos *in vitro* mostram que o Kit ligante (KL) atua melhorando a sobrevivência celular em oócitos de folículos primordiais através da fosforilação da via da proteína quinase (Akt; REDDY et al., 2005).

Sabe-se que um dos principais fatores responsáveis pela quiescência dos folículos primordiais é o Forkhead transcription fator (FOXO3), um fator de transcrição que atua regulando a formação de folículos primordiais (JOHN et al., 2007). O KL atua na fosforilação e supressão funcional do FOXO3, estimulando a saída dos folículos primordiais do estágio de dormência para sua ativação e posterior crescimento (LIU et al., 2007). Outro fator de suma importância na manutenção da quiescência folicular é o Hormônio Anti-mulleriano (AMH).

O AMH é um fator que atua suprimindo a ativação de folículos primordiais em camundongos (DURLINGER et al., 2002a) e mulheres (CARLSSON et al., 2006). Alguns estudos mostram que a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pode desempenhar um papel na regulação da ativação de folículos primordiais (LIU et al., 2006; REDDY et al., 2005). No entanto, o homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10 (PTEN), uma fosfatase lipídica, conhecida como uma antagonista da via PI3K, provoca uma supressão da ativação dos folículos primordiais através da manutenção da dormência desses folículos (REDDY et al., 2008). Além disso, em mulheres, a Proteína 1 de Esclerose Tuberosa (TSC1) possui a capacidade de suprimir a ativação folicular, regulando negativamente o Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em mamíferos (mTORC1), que atua na manutenção da quiescência dos folículos primordiais (ADHIKARI et al., 2010).

O mTORC1 é uma serina/treonina quinase que pode atuar promovendo a ativação dos folículos primordiais, regulando assim o crescimento e a proliferação celular em vários tipos de células em resposta a fatores de crescimento e nutrientes. Ao mesmo tempo, a sobrevivência de folículos primordiais é mantida através da PI3K presente no citoplasma que vai atuar iniciando a produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3) a partir do PIP2, no entanto, o PTEN converte o PIP3 em PIP2. Em estudos recentes verificou-se que TSC e PTEN manipulam a ativação folicular através da regulação negativa da proteína ribossomal S6 (rpS6; ADHIKARI et al., 2009). Na ausência das moléculas que promovem a sobrevivência dos folículos primordiais, incluindo PDK1 e rpS6, todos os folículos primordiais são perdidos prematuramente a partir do seu estado quiescente (REDDY et al., 2009).

2.6 Crescimento de folículos pré-antrais (primários e secundários)

Com a ativação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa que circundam o oócito sofrem alterações morfológicas modificando-se de pavimentosas a cúbicas. Estas, por sua vez, se multiplicam acompanhando o crescimento do oócito, dando origem ao folículo primário. Nesses folículos, as glicoproteínas que irão formar a zona pelúcida (Zona pelúcida 1 - ZP1, Zona pelúcida 2 - ZP2 e Zona pelúcida 3 - ZP3) (LEE et al., 2000; RANKIN et al., 2001) começam a ser sintetizadas, tornando-se visíveis apenas em folículos secundários (FIGUEIREDO et al., 2008). Em bovinos, o diâmetro dos folículos primários varia de 40 a 60 μm , com o oócito medindo cerca de 30 a 40 μm de diâmetro (BECKERS et al., 1996).

Embora a foliculogênese pré-antral não seja dependente de gonadotrofinas, os receptores do FSH (R-FSH) já são encontrados em folículos primários (OKTAY et al., 1997).

Estudos recentes analisaram os efeitos de hormônios, fatores de crescimento, e suas vias de sinalização intracelular numa tentativa de compreender os mecanismos que controlam o crescimento folicular pré-antral. Para isso, fatores de crescimento são importantes para a regulação da foliculogênese inicial.

Os fatores locais que agem no crescimento dos folículos primários para secundários são: GDF-9 (BODENSTEINER et al., 1999), Ativina-A (HULSHOF et al., 1997), EGF (GUTIERREZ et al., 2000), FGF-2 (NUTTINCK et al., 1996), fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb; VERNON; SPICER, 1994), R-FSH (WANDJI et al., 1992), receptor do hormônio do crescimento (R-GH; KOLLE et al., 1998), Receptor do IGF do tipo 1 (IGF-R1; ARMSTRONG et al., 2000).

Por mecanismos independentes de gonadotrofinas, ocorre uma contínua proliferação das células da granulosa com formação do folículo secundário constituído por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica ao redor do oócito. Os folículos primários se desenvolvem até chegar ao estágio de folículos secundários pelo crescimento do oócito e pela atividade mitótica das células da granulosa. Durante a multiplicação destas células, evidencia-se a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que pode ser usado como um marcador confiável de crescimento folicular (SILVA et al., 2014). Os fatores locais que agem no crescimento dos folículos secundários são: IGF-1 (WANDJI et al., 1992), VEGF (YANG et al., 2007) e FGF-2 (VAN WEZEL et al., 1995). Nos estudos *in vitro*, o cultivo de folículos secundários bovinos resulta apenas na formação de cavidade antral, não possuindo relatos de sucesso na produção de oócitos meioticamente competentes (VASCONCELOS et al., 2013).

Folículos que possuem quatro ou mais camadas de células da granulosa, iniciam o aparecimento das células da teca, aumentam a vascularização possibilitando a atuação das gonadotrofinas nas células da granulosa e no oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). As células da teca são originárias de células precursoras presentes no estroma ovariano (HONDA et al., 2007) e possuem características estruturais de células secretoras de esteroides, incluindo mitocôndria com cristas vesiculares, retículo endoplasmático agranular e vesículas lipídicas (MAGOFFIN, 2005).

A mitocôndria contém a primeira enzima na via esteroidogênica, a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol pelo citocromo P450 (CYP11A) e o retículo endoplasmático contém o restante das enzimas necessárias para produzir os andrógenos, que

são necessários para a produção de estradiol nas células da granulosa. A expressão do RNAm que codifica as enzimas esteroidogênicas foi observada em células da teca de folículos pré-antrais de bovinos, embora, em ovinos, a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (STAR) tenha sido bloqueada nessas células (BÁO; GARVERICK, 1998).

2.7 Crescimento dos folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios)

Com o desenvolvimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em múltiplas camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação dos folículos terciários em antrais e posteriormente em pré-ovulatórios (BARNETT et al., 2006). Com o desenvolvimento desses folículos, as células da granulosa são diferenciadas em células do cumulus (mais próximas ao oócito) e células murais (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O fluido antral formado é um composto rico em substâncias reguladoras derivadas do sangue (gonadotrofinas) que flui através dos capilares da teca ou secreções das células foliculares, como por exemplo, esteroides, fatores de crescimento e proteoglicanos. A produção desse fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos que ocorre com o desenvolvimento do folículo. Em adição, o fluido folicular fornece inúmeros fatores que suportam as funções foliculares apropriadas, incluindo a qualidade dos oócitos, tais como a interleucina-6 (IL-6), proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2), anfiregulina (AREG) e GDF-9 (DUMESIC et al., 2015).

Através da secreção de fatores parácrinos como GDF-9, proteína morfogenética óssea -15 (BMP-15) e fator de crescimento fibroblástico -8b (FGF-8b), o oócito controla a expressão de proteínas do ciclo celular e a síntese de DNA em células da granulosa promovendo a sua proliferação (GILCHRIST et al., 2006). Além disso, o oócito controla as atividades metabólicas nas células do cumulus incluindo a expressão de aminoácidos transportadores e enzimas metabólicas necessárias para a manutenção do metabolismo oocitário (SU; SUGIURA; EPPIG, 2009). Além dessas substâncias, estão presentes no oócito, gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas consideradas fundamentais para a determinação da qualidade oocitária (WU et al., 2007). A formação do antro divide as células da granulosa em duas populações diferentes: as células da granulosa que ficam próximas ao oócito sofrem diferenciação para formar as células do cumulus, enquanto que as demais se diferenciam em células da granulosa murais.

Com a progressão do desenvolvimento dos folículos antrais, o FSH torna-se criticamente determinante para o crescimento e a sobrevivência dos folículos, os quais passam a ser dependentes desta gonadotrofina. A partir deste ponto, a concentração de FSH circulante disponível que determinará se o folículo sofrerá atresia ou continuará o seu desenvolvimento até os estágios antrais tardios. O desenvolvimento desses folículos pode ser subdividido nas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O recrutamento de um grupo de folículos antrais e a seleção de um folículo dominante são as principais características desta fase, e nas espécies monovulatórias, como a bovina, somente um folículo será ovulado (BAERWALD et al., 2003).

Os folículos antrais são recrutados e crescem simultaneamente em uma onda folicular sob o controle das gonadotrofinas (FORTUNE et al., 2001). Em bovinos, já foi demonstrado que a dinâmica folicular acontece observando um padrão de uma, duas, três ou até quatro ondas de desenvolvimento folicular por ciclo estral (BARUSELLI et al., 2007). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular (FORTUNE, 1994).

Ao iniciar uma nova onda folicular, um determinado grupo de folículos é recrutado, apresentando crescimento simultâneo, sobre estímulo do FSH, mas somente um deles será selecionado (GINTHER et al., 2003). Esta etapa estende-se por dois a três dias e os folículos apresentam uma taxa de crescimento constante (MIHM; BLEACH, 2003; PETER et al., 2009). A partir de então, este folículo passará a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo assim o desenvolvimento e levando à inibição do recrutamento de um novo grupo de folículos. Na presença de níveis elevados de progesterona, o folículo dominante tornar-se-á anovulatório, em virtude da frequência na pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH) ser baixa (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; GINTHER et al., 1996).

Na espécie bovina, a formação dos folículos antrais é observada aos 230 dias de gestação (RÜSSE, 1983). A partir deste estágio, o diâmetro do folículo aumentará notavelmente em virtude do crescimento oocitário, proliferação das células da granulosa e da teca e pela expansão da cavidade antral (DRIANCOURT, 2001).

Os folículos antrais podem ser classificados como pequenos ou grandes. Os pequenos folículos antrais possuem crescimento rápido em diâmetro em decorrência do acúmulo de fluido folicular (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). A partir desta fase, os folículos tornam-se dependentes destes hormônios até o estágio de folículos pré-ovulatórios, onde apresentam um diâmetro em torno de 10 a 12 mm em *B. indicus* e 12 a 15 mm em *B. taurus* (GINTHER, 2003).

Ao atingirem o estágio de pré-ovulatórios, o oócito torna-se circundado por várias camadas de células do cumulus. Nessa fase final do desenvolvimento folicular, ocorre diminuição dos níveis circulantes de FSH em resposta ao alto nível de estradiol e inibina produzidos pelo folículo e observa-se então a formação do folículo pré-ovulatório. Neste estágio as células da granulosa param de se multiplicar e iniciam o processo final de diferenciação devido à ação do LH (DRIANCOURT, 2001).

2.8 Ovulação

O aumento nos níveis de estrógenos da fase pré-ovulatória estimula a hipófise a liberar na corrente sanguínea concentrações elevadas de LH eficazes para o processo de ruptura folicular e ovulação. Na fêmea bovina, esse evento ocorre aproximadamente 28 horas após o pico de LH e de 24 a 32 horas após o início do estro (HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y., 2000; SENGER, 2003). Este evento é marcado por alterações moleculares que modulam simultaneamente a expressão gênica nas células foliculares, promovendo alterações estruturais e fisiológicas no ambiente folicular, que culminam na liberação do oócito maduro e posterior formação do corpo lúteo.

A ovulação envolve a ruptura do ápice folicular que ocorre em decorrência do elevado fluxo sanguíneo, colapso do tecido conectivo e contrações ovarianas. Estes eventos são controlados por histamina, prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas (fator de necrose tumoral- α -TNF- α e interleucina-1 - IL-1) (SMITH et al., 1994; BRÄNNSTRÖM et al., 1995; GÉRARD et al., 2004; SENGER, 2003; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Acompanhando a hiperemia local as células da teca interna se tornam edematosas pelo aumento da permeabilidade vascular causado pela histamina. Essa condição edematosa causa aumento da pressão hidrostática ao redor do folículo que deve facilitar a sua eventual ruptura (SENGER, 2003). Em *B. taurus*, somente folículos com diâmetro ≥ 12 mm adquirem capacidade ovulatória, devido as altas concentrações de receptores para LH (R-LH) (SARTORI et al., 2001). O pico pré-ovulatório de LH promove o remodelamento da matriz extracelular e desencadeia a clivagem de proteínas da membrana celular, envolvendo proteases, colagenases e fatores vasoativos (ESPEY, 1980). Após a ligação do LH ao receptor do LH (R-LH), presente em células da granulosa e da teca de folículos dominantes (PENG et al., 1991), a clássica via da adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e da proteína quinase dependente de AMPC (PKA) são ativadas e induzem a expressão de fatores parácrinos e autócrinos que

iniciam a cascata ovulatória (CONTI, 2002). A partir do pico de LH, o oócito retoma sua capacidade de reiniciar a meiose, os CCOs iniciam o processo de expansão e os andrógenos sintetizados nas células da teca são transportados para as células da granulosa, sofrem a ação da aromatase e são convertidos em 17β -estradiol (ESPEY, 1980).

O aumento na concentração de AMPc nas células da granulosa ativa a via da PKA que por sua vez, catalisa a fosforilação de proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB – AMPc *response element binding*), um fator de transcrição nuclear que aumenta a transcrição de genes envolvidos no processo de ovulação (RICHARDS, 2001). As prostaglandinas parecem aumentar a atividade colagenolítica de tecido folicular (FORTUNE et al., 2009) e induzem a vasodilatação tecidual e alteração na região apical do folículo pré-ovulatório (SIROIS et al., 2004). Elas são produzidas a partir do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase (COX). A COX possui duas principais isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa em muitos tecidos de forma constitutiva (DEWITT; SMITH, 1995), enquanto a COX-2 é uma enzima induzível relacionada a processos fisiopatológicos (HINZ; BRUNE, 2002). Em vacas, a expressão de RNAm e proteína para COX 2 foi demonstrada em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (LIU; SIROIS, 1998).

Após o pico ovulatório de LH, a concentração de P4 torna-se maior em relação ao E2 no ovário, dando início ao processo de luteinização (KOMAR et al., 2001). A redução da concentração de E2 intrafolicular ocorre pela queda de enzimas esteroidogênicas como 17α -hidroxilase (17α -OH), o que reflete na baixa produção de andrógeno, e aromatase (P450), que diminui a capacidade das células da granulosa para converter andrógeno em E2 (KOMAR et al., 2001).

A fim de compreender a importância desses mecanismos intrínsecos se faz necessária o entendimento e a intensificação no uso de fêmeas com características superiores propostas no estudo.

2.9 Características indicadoras de fertilidade em fêmeas bovinas

2.9.1 Contagem folicular antral (CFA)

A senescência ovariana é caracterizada pela redução do “*pool*” de folículos primordiais, correspondente à reserva folicular ovariana. Desta forma, a mensuração direta do “*pool*” de folículos primordiais é impossível. A fim de facilitar a predição dos folículos pré-antrais,

utiliza-se o número de folículos primordiais que está indiretamente relacionado com o número de folículos em crescimento (SCHEFFER et al., 1999).

Cushman et al. (1999) confirmaram esta correlação positiva ($r=0,92$; $P<0,01$) entre o número de folículos primordiais e o número de folículos em crescimento, e que o número de folículos primordiais está relacionado com o número de folículos antrais no ovário bovino, sugerindo a relação entre a reserva ovariana e a longevidade reprodutiva. Sabe-se que a avaliação da CFA prediz melhor o aspecto quantitativo da reserva ovariana (SCHEFFER, 2003), no entanto, a avaliação da CFA requer ultra-sonografia transvaginal para ser realizada a contagem.

O número de folículos antrais é altamente variável entre as fêmeas (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; PONTES et al., 2011), porém em bovinos, há alta repetibilidade dentre indivíduos (BURNS et al., 2005). O número médio de folículos manteve-se altamente estável durante as avaliações de ultrassom ($r=0,90-0,92$; $P\leq 0,05$) (SILVA-SANTOS et al., 2014b). Diante disso, é possível, através de um único exame de ultrassonografia de rotina, identificar fêmeas com baixo, intermediário ou alto CFA.

Fêmeas *Bos taurus taurus* podem ser classificadas de acordo com a CFA descrita por Ireland et al. (2008); Burns et al. (2005), em baixa (≤ 15 folículos antrais), intermediária (16 a 24 folículos antrais) ou alta CFA (≥ 25 folículos antrais). De acordo com a média da CFA observada devido à maior população folicular antral intrinsecamente mostrada pelas fêmeas *Bos indicus* da raça Nelore, sugeriu-se uma categorização da CFA, a qual considerou baixa CFA ≤ 32 , intermediária CFA entre 32 e 48 e alta CFA ≥ 48 folículos por animal (RODRIGUES et al., 2015).

Estudo demonstrou que o número de folículos primordiais, transição, primários, secundários e antrais morfológicamente saudáveis foi menor ($P<0,05$) para animais com baixo CFA *versus* alto (IRELAND et al., 2008). Desta forma, a depleção da reserva ovariana está associada com a senescência reprodutiva em fêmeas bovinas e a CFA pode ser um indicador de tempo de vida produtiva.

Segundo Burns et al. (2005), o declínio no número de folículos antrais durante as ondas foliculares é indicativo de senescência ovariana. Diferenças entre a idade e a CFA foi demonstrada em vacas de corte, indicando que, o aumento da CFA ocorre até 5 anos de idade e após inicia o declínio (CUSHMAN et al., 2009). Outro estudo confirmou que vacas jovens (12 meses) e de meia-idade (7-8 anos) obtiveram melhor competência no desenvolvimento de oócitos recuperados através de folículos antrais por OPU durante o desenvolvimento folicular quando comparada com vacas velhas (≥ 15 anos) (SU et al., 2012).

Em relação ao estágio reprodutivo, a CFA não diferiu ($P=0,71$) nas fêmeas nulíparas ($38,6\pm 23,96$), primíparas ($47,54\pm 26,16$) e múltiparas ($41,08\pm 25,54$) e foi negativamente correlacionada ($r=-0,17$; $P<0,001$) com a idade ao primeiro parto, de tal forma que, quanto menor a idade ao primeiro parto maior a CFA (MACULAN et al., 2015, dados não publicados).

A variação no número de folículos durante ondas não-ovulatórias está inversamente relacionada com a concentração de FSH periférico (BURNS et al., 2005). Desta forma, elevado número de folículos estimula baixa concentração de FSH circulante, enquanto baixo número de folículos, estimula altas concentrações circulantes de FSH durante as ondas foliculares do ciclo estral (IRELAND et al., 2007). Sabe-se que a CFA é o melhor preditor disponível de resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, mostrando que, a precisão a qual constitui o folículo antral é variável, com diâmetros que variam entre 2-5 e 2-10 mm. Desta forma, a CFA mostra-se mais eficiente que o FSH basal na predição da baixa resposta ovariana (den TONKELAAR; te VELDE; LOOMAN, 1998).

Células da granulosa de fêmeas com baixa CFA tiveram capacidade diminuída de responder à ação FSH, mostrando a baixa capacidade de resposta ovariana à estimulação de gonadotrofina em fêmeas *B. taurus* de corte e de leite (SCHEETZ et al., 2012). Estas observações potencialmente explicam porque fêmeas com baixo CFA respondem fracamente à estimulação de gonadotrofina (IRELAND et al., 2007), apesar do número significativo de folículos remanescentes relativos na reserva ovariana (IRELAND et al., 2008).

Além disso, vacas com baixa CFA possuem maiores concentrações de FSH no sangue durante ondas foliculares. A alta variação no número de folículos antrais está associada com a ação do FSH e expressão de genes que estimulam a produção de E2 pelas células granulosas, como a enzima esteroideogênica do citocromo P19A1 (CYP19A1). Além de atuar na diferenciação e funcionamento das células da teca pela expressão do gene membro 1 da família do domínio TBC1 (TBC1D1), aumenta a capacidade de resposta do E2 por meio dos genes receptor do estrogênio -1 e -2 (ESR-1 e ESR-2) e determinantes da qualidade do oócito em células do cumulus, como o gene catepsina B (IRELAND et al., 2009).

Jimenez-Krassel et al. (2009) forneceram uma visão sobre os fatores potenciais que podem causar a deficiência na função lútea em ovários com baixa CFA. Nesses ovários há aumento da secreção de LH, porém, com dessensibilização do receptor desse hormônio, diminuição da responsividade, diminuição da proteína esteroideogênica (STAR), deficiência inerente na capacidade das células granulosas de sofrer luteinização e infertilidade (por

exemplo, baixa progesterona, baixo crescimento endometrial) em indivíduos com reservas ovarianas diminuídas.

A raça e a genética são fatores que estão relacionados diretamente com a CFA, demonstrando assim, diferenças na capacidade reprodutiva entre os animais. Os números médios (\pm SD) de folículos antrais foram de 35 ± 9 (*Bos indicus*) e 38 ± 6 (Nelore x Angus; 1/2 *Bos indicus-taurus*) para CFA alto e 10 ± 3 (*Bos indicus*) e 12 ± 2 (Nelore x Angus; 1/2 *Bos indicus-taurus*) folículos para baixa CFA ($P\leq 0,05$; SILVA-SANTOS et al., 2014a). Os números de folículos pequenos (2 a 5mm), médios (6 a 8mm) e grandes ($>$ ou $=9$ mm) em animais da raça Brahman foram maiores ($P<0,05$) do que nas vacas Angus e/ou Senepol (39 ± 4 ; 21 ± 4 e 33 ± 4 , respectivamente). O número desses folículos em animais da raça Senepol foi maior ($P<0,001$) do que nas vacas Angus (ALVAREZ et al., 2000). Estes resultados sugerem a diferença na reserva ovariana devido ao tipo biológico, principalmente relacionado a diferenças genéticas.

A CFA pode influenciar a produção de oócitos e embriões tanto *in vivo* quanto *in vitro*, especialmente em relação ao número de embriões produzidos por doadora, além da eficiência do processo, com taxas mais elevadas em fêmeas de alta CFA (IRELAND et al., 2008). A variabilidade individual intrínseca da CFA tem gerado consequências importantes na qualidade oocitária e embrionária em animais taurinos e mestiços (IRELAND et al., 2008; SILVA-SANTOS et al., 2014b). A alta variação na CFA também está positivamente correlacionado ($r=0,80-0,90$; $P<0,01$) com o número total de oócitos morfolologicamente saudáveis (IRELAND et al., 2008). O número médio de CCOs recuperados ($36,90\pm 13,68$ vs. $5,80\pm 3,40$) foi maior ($P<0,05$) em fêmeas de alta vs. baixa CFA, resultando em maior ($P<0,05$) número de embriões ($6,10\pm 4,51$ vs. $0,55\pm 0,83$). O número médio de embriões por coleta foi maior ($P<0,05$) na classe com alta vs. baixa CFA ($6,95\pm 5,34$ vs. $1,9\pm 2,13$; SILVA-SANTOS et al., 2014b). Desta forma, fêmeas *B. taurus* com baixa CFA possuem menor número de embriões produzidos *in vitro* comparado com fêmeas com alta CFA (1,3 vs. 4,9 embriões, $P<0,05$; IRELAND et al., 2007).

A importância da CFA e sua relação com as taxas de prenhez também devem ser enfatizadas. Alvarez et al. (2000) verificaram que a baixa CFA foi associada com redução da taxa de prenhez em novilhas devido à menor competência de produção de embriões. Vacas Brangus Ibagé com um intervalo de partos (IDP) de um ano foram comparadas com vacas que têm um IDP de dois anos. As vacas com os IDP menores tiveram maiores CFA ($P<0,05$) do que vacas com IDP maiores durante 15 dias pós- desmame (OLIVEIRA et al., 2002).

Cushman et al. (2009) afirmam que a taxa de prenhez em novilhas mestiças de alta CFA (≥ 25) foi superior ($P < 0,05$) a de baixa (≤ 15) ($94,3 \pm 2,3$ vs. $85,5 \pm 3,4$, respectivamente). No entanto, estudo recente com vacas Nelore mostrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na taxa de concepção entre vacas com baixa, intermediária e alta CFA (58,6; 48,6 e 51,9%, respectivamente; SANTOS et al., 2016). Na medicina humana também é evidente a associação da CFA com produção oocitária. Huang et al. (2001) dividiram mulheres em grupos de acordo com CFA. Grupo A menos que 5; grupo B entre 6 e 10; grupo C entre 11 e 15 e grupo D mais que 16 folículos antrais. Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número de oócitos recuperados por aspiração no grupo A e B *versus* grupo C e D. A taxa de gestação foi de 20% nas pacientes do grupo A-B e de 50% nos pacientes do grupo C-D; entretanto, esses resultados não foram significativos ($P = 0,29$; LONEGRO et al., 2016).

Sabe-se que a CFA é altamente correlacionada com o AMH. O AMH é membro glicoproteico da família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β), produzido pelas células da granulosa de folículos ovarianos de forma independente do FSH. O AMH possui um papel de marcador que indica o número de folículos que fizeram a transição do “*pool*” de folículos primordiais para folículos em crescimento, sem a adição de gonadotrofinas. Assim, esse fator liberado por folículos em crescimento irá refletir a quantidade de folículos primordiais quiescentes (DURLINGER; VISSER; THEMME, 2002b), sugerindo que a concentração de AMH no soro reduz ao longo da vida reprodutiva da fêmea (LEE et al., 1996).

O AMH pode ser mensurado durante todo o ciclo estral. Em vacas *taurus*, as concentrações de AMH durante o ciclo estral natural e sincronizado foram positivamente correlacionadas ($r = 0,67$; $P < 0,001$) ao analisar individualmente entre novilhas e variadas entre novilhas de corte das raças Angus e Charolês. Aumento ($P < 0,05$) nas concentrações de AMH foram notados em novilhas de corte comparadas com novilhas de leite das raças Holandesa e Jersey ($0,0638 \pm 0,01$ ng/mL e $0,0402 \pm 0,01$ ng/mL, respectivamente; PFEIFFER et al., 2014).

A CFA e AMH são preditores de oócitos recuperados e do número de embriões com boa qualidade disponíveis para transferência e congelamento em humanos (MAJUMDER et al., 2010). Fêmeas com alto AMH possuem maior número de folículos aspirados, complexos cumulus-oócitos recuperados e número de blastocistos produzidos, porém não foi observada diferença referente à taxa de produção de blastocisto em ambos *B. taurus* (Holandesa) e *B. indicus* (Nelore, $P < 0,0001$; GUERREIRO et al., 2014).

2.9.2 Volume ovariano e morfometria da genitália externa

A CFA está positivamente associado com o número, a qualidade e a quantidade de oócitos e esses estão ligados à capacidade da fêmea engravidar (IRELAND et al., 2011).

Sabe-se que as características morfológicas do ovário variam em função do estágio reprodutivo, da fase do ciclo estral e do período de gestação podendo ser utilizadas como parâmetro na avaliação clínica e funcional do órgão (CHACUR et al., 2006). Aliado a isso, encontrou-se relação entre o volume ovariano e sucesso reprodutivo em ciclos de reprodução assistida (GINTHER, 1997).

Embora haja claramente outros fatores que influenciam a variação no tamanho dos ovários, Cushman et al. (2009) relataram correlação baixa ($r=0,05$; $P=0,007$), porém positiva entre o peso ao nascer, peso do ovário e CFA em novilhas neonatais que tem duração até à maturidade reprodutiva. Modina et al. (2013) mostram redução significativa no peso, comprimento e altura ($5,07\pm 0,28$ g; $3,82\pm 0,10$ cm e $1,79\pm 0,06$ cm, respectivamente) de ovários com baixa ($4,51\pm 0,32$) comparado com alta ($31,93\pm 1,67$) CFA ($13,29\pm 0,68$ g; $4,67\pm 0,09$ cm e $2,69\pm 0,06$ cm; $P<0,001$, respectivamente). Em consonância, Ireland et al. (2008) observaram que, o peso, o comprimento e a altura ($3,05\pm 0,33$ g; $23,3\pm 1,4$ e $12,3\pm 1,1$ mm; $P<0,05$, respectivamente) dos ovários de animais com baixa (≤ 15) foram menores ($P<0,05$) que alta (≥ 25) CFA ($7,11\pm 0,41$ g; $P<0,0001$; $28,3\pm 1,3$ e $15,5\pm 0,8$ mm; $P<0,05$, respectivamente) CFA. Além disso, a variação entre os animais nas classes de CFA durante as ondas foliculares foi positivamente correlacionada ($r=0,80-0,90$; $P<0,01$) com variação no peso ovariano e número total de folículos (IRELAND et al., 2008).

Kwee et al. (2007) demonstraram que a CFA e o volume total do ovário atuam na predição da resposta ovariana à hiperestimulação na FIV através da análise de regressão logística ($r=0,87$, $r=0,92$; $P<0,001$, respectivamente). Além disso, volume ovariano baixo ($<3\text{cm}^3$) dificulta a resposta à estimulação ovariana e induz a menor taxa de gestação em mulheres (TEIXEIRA; MAHESWARAN; DONAHOE, 2001).

Mesquita et al. (2016) classificou o volume ovariano como pequeno ($\leq 7\text{mm}^3$), médio ($7-11\text{mm}^3$) e grande ($>11\text{mm}^3$) e analisou a qualidade do CCOs. A qualidade de CCOs no grupo com ovários de volume médio ($3,19\pm 0,08$) foi superior ($P<0,05$) ao pequeno ($2,96\pm 0,08$) e grande ($2,95\pm 0,09$). Houve correlação positiva entre a CFA e peso ovariano ($r=0,90$; $P<0,001$) e com o número total de folículos e oócitos saudáveis presentes nos ovários ($r=0,89$; $P<0,001$; IRELAND et al., 2011; CUSHMAN et al., 2009). Outro estudo mostrou correlação positiva ($P<0,01$) do volume ovariano com o número de oócitos recuperados,

maduros, fertilizáveis e o total de embriões ($r=0,75$; $r=0,63$; $r=0,56$ e $r=0,54$, respectivamente; MERCÉ et al., 2006).

Associada a morfometria do volume ovariano, uma característica fenotípica de superioridade reprodutiva identificada recentemente foi a morfometria da genitália externa da fêmea. A vulva é a porção final do trato genital tubular formada pelos dois lábios, pequenos e grandes, que se unem conjuntamente nos ângulos dorsal e ventral. O ângulo dorsal é arredondado, já o ventral é agudo (KONIG et al., 2004). Esse último, situa-se aproximadamente 5 cm caudal e ventralmente a mesma distância ao nível do arco isquiático (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008).

A rima vulvar, também conhecida como fenda ou pudendo vulvar, é a abertura externa em forma de fenda vertical, ou seja, a fissura entre os grandes lábios. O tamanho da rima consiste no comprimento entre as comissuras dorsais e ventrais da fenda. A largura da vulva pode ser determinada pela distância entre as bordas laterais a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus (MACULAN et al., 2015, dados não publicados).

Sabe-se que alta CFA indica superioridade reprodutiva, desta forma, estudo mostrou relação entre a CFA e a morfometria externa do aparelho reprodutivo em fêmeas *Bos indicus*. MESQUITA et al. (2016) demonstrou que a CFA foi maior ($P=0,035$) em fêmeas com maior comprimento da rima relativa ao tamanho corporal comparada com menor comprimento da rima ($18,96\pm 1,97$ cm e $14,76\pm 1,51$ cm, respectivamente). Similarmente, a CFA em fêmeas com maior largura da vulva foi maior ($P=0,0001$) comparada com menor largura da vulva ($20,08\pm 1,36$ cm e $11,16\pm 1,60$ cm, respectivamente). Concluiu-se que a largura da genitália externa relativa com o tamanho corporal é boa preditora de reserva folicular em fêmeas bovinas da raça Tabapuã (MESQUITA et al., 2016). Além disso, a largura vulvar em fêmeas de alta CFA ($8,81\pm 0,12$ cm) foi superior ($P=0,05$) a de média e pequena largura vulvar ($8,42\pm 0,11$ cm e $8,38\pm 0,13$ cm respectivamente; MACULAN et al., 2015, dados não publicados).

Recentes estudos com fêmeas da raça Tabapuã demonstram que a largura vulvar e a CFA foram medidas que indicaram superioridade reprodutiva, indicando ser características associadas com a fertilidade. Sendo assim, a proposta da utilização desse fenótipo (morfometria da genitália externa) deve ser considerada em modelos que pretendem ser aplicados na seleção para a fertilidade (MACULAN et al., 2015, dados não publicados; MESQUITA, 2016).

2.10 Fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

As diferenças entre *B. indicus* e *B. taurus* iniciam ainda durante o desenvolvimento embrionário na avaliação da variação na população folicular da reserva ovariana. Estudo avaliou cortes histológicos de ovários de fetos, novilhas e vacas e concluíram que há grande variação individual no número de folículos ovarianos de zebuínos comparados com taurinos e similaridade entre a população de folículos pré-antrais de fetos e novilhas nesses grupos genéticos (SILVA-SANTOS et al., 2011).

Sabe-se que a dinâmica folicular ovariana é um processo contínuo de crescimento e regressão folicular. O conhecimento das ondas de crescimento e regressão folicular favorece a execução de programas de superovulação, sincronizações do ciclo estral e da ovulação. A dinâmica folicular pode ser dividida nas etapas de recrutamento, seleção e dominância dos folículos antrais (BORGES et al., 2004, GINTHER et al., 1996). Verificou-se maior ($P < 0,05$) recrutamento de folículos por onda em *B. indicus* comparada com *B. taurus* ($33,4 \pm 3,3$ vs. $25,0 \pm 2,5$, respectivamente; CARVALHO et al., 2008) e ($39,0 \pm 4,0$ vs. $21,0 \pm 4,0$, respectivamente; ALVAREZ et al., 2000). Este fato pode ser explicado pelas maiores concentrações circulantes de IGF-1 e insulinas livres em fêmeas *B. indicus* desta forma, há um aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH, favorecendo assim o recrutamento folicular (ALVAREZ et al., 2000; SARTORI; BARROS, 2011). Além disso, vacas *B. indicus* possuem mais ondas foliculares, maior número de folículos, recrutam maior número de folículos por onda folicular ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$ em *B. taurus*; $P < 0,05$, CARVALHO et al., 2008) com maior número de oócitos recuperados por aspiração folicular (de 3 a 4 vezes maior) que as vacas *B. taurus* ($P < 0,05$; VIANA et al., 2000).

O padrão de crescimento folicular através das ondas foliculares é caracterizado pelo recrutamento de um “pool” de folículos na fase antral inicial, em resposta ao aumento na concentração circulante de FSH, e pela posterior seleção e dominância de um folículo. Este produz inibina estimulando a atresia dos demais folículos subordinados que torna capaz de ovular em resposta ao pico de LH (GINTHER, 1997). Quanto a esse hormônio gonadotrófico, as raças zebuínas apresentam menor capacidade de secreção de LH em relação às raças europeias (D’OCCHIO et al., 1990). Já em relação aos hormônios esteroides, suas concentrações nas raças zebuínas mostram-se inferiores aos observados nas raças europeias (SEGERSON et al., 1984).

Existem também diferenças em relação à quantidade de ondas foliculares durante o ciclo estral em *Bos indicus* e *Bos taurus*. Nas fêmeas *Bos indicus* foi evidenciada a presença

de duas ou três ondas foliculares em quase todos os ciclos estrais. Da mesma forma para fêmeas *Bos taurus*, que apresentam dinâmica folicular semelhante (SARTORI et al., 2004). Além disso, verifica-se maior incidência de ciclos estrais com duas ou três ondas foliculares e menor frequência com uma e quatro ondas em *Bos indicus* (RHODES et al., 1995a). Outros trabalhos mostram que em zebuínos, são necessários três a quatro ondas foliculares por ciclo estral para a ocorrência da ovulação (Brahman – RHODES et al., 1995b; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000). Já fêmeas *Bos taurus* da raça Holandesa demonstraram necessitar de duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GINTHER et al., 1989).

É importante ressaltar que em ciclos estrais com padrão de três ondas foliculares, o folículo dominante da segunda onda é menor que o da primeira e terceira onda, apesar de não ter sido verificado efeito da duração do ciclo estral no crescimento folicular em animais da raça Nelore. Uma possível explicação para a diferença nos diâmetros foliculares é a concentração plasmática de progesterona. A primeira onda folicular ocorre na presença de uma baixa concentração de progesterona (corpo lúteo em formação) sendo insuficiente para efetuar um feedback negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário para impedir a liberação de LH (SÁVIO et al., 1992).

Pulsos de baixa frequência de LH (entre 2 e 3ng/mL), observados durante a fase lútea do ciclo estral, levam à regressão do folículo dominante e ao início de novas ondas foliculares (SÁVIO et al., 1992). A segunda onda inicia-se na presença de um corpo lúteo totalmente formado e que secreta elevada concentração de progesterona, suficiente para inibir a liberação de LH. O menor diâmetro do folículo da segunda onda pode ser devido à menor duração de crescimento (4,6 e 5,4 dias) quando comparado com os folículos da primeira (6,3 dias) e terceira ondas (6,1 dias). Entretanto, esse padrão não foi observado em animais da raça Nelore (SÁVIO et al., 1992). A terceira onda coincide com a redução da secreção de progesterona pelo corpo lúteo, resultando no aumento da frequência de pulsos de LH até um pico de 30 a 35ng/mL. Nessa fase verifica-se o rápido crescimento folicular e a ovulação (SÁVIO et al., 1992).

Outro aspecto é a variação do diâmetro máximo dos folículos dominantes em *B. indicus* e *B. taurus*. Já foi demonstrado que a herdabilidade estimada para diâmetro folicular foi de $0,16 \pm 0,03$ (MacNEIL et al., 2006). De acordo com Buratini et al. (2000), ovários de novilhas *Bos indicus* possuem maior número de folículos < 5 mm e menor número de folículos ≥ 5 mm do que novilhas *Bos taurus*.

Em fêmeas pós-púberes zebuínas, o diâmetro do folículo dominante é menor (10-13 mm, $P<0,05$; CASTILHO et al., 2007) do que em taurinas no mesmo estágio reprodutivo (16-20mm, $P<0,05$; IRELAND et al., 2000). O menor diâmetro comparado aos taurinos pode estar relacionado à menor taxa de crescimento dos folículos dominantes em vacas zebuínas (0,8mm/dia; FIGUEIREDO et al., 1997 vs. 2,0mm/dia em taurinos; MURPHY et al., 1990).

O diâmetro máximo do folículo dominante da primeira onda folicular em vacas Brahman e Senepol (15,3±0,6mm e 13,9±0,5mm) foi maior ($P<0,01$) do que nas Angus (11,4±0,6mm), porém, o diâmetro máximo do folículo ovulatório em vacas Brahman (15,6±0,5mm) foi maior ($P<0,01$) que Angus ou Senepol (12,8±0,4mm e 13,6±0,4mm, Alvarez et al., 2000). Esses resultados sugerem que há um diâmetro folicular considerado ótimo sendo que as vacas Angus que possuíam um diâmetro folicular médio se aproximaram mais do diâmetro favorável. Esse fato pode explicar as taxas de fecundidade mais elevadas em vacas Angus comparadas com vacas Brahman ou Senepol (PERRY et al., 2007).

Outra diferença detectada entre os grupos genéticos *Bos indicus* e *Bos taurus* é o diâmetro do corpo lúteo (CL). Fêmeas *Bos indicus* possuem menor diâmetro do CL em relação à *Bos taurus* (PINHEIRO et al., 1998). Entretanto, Alvarez et al. (2000) verificaram que o diâmetro máximo do CL foi maior ($P<0,05$) em fêmeas Senepol (22,2±0,3mm) do que em Angus (19,6±0,2mm) e tendeu ($P<0,10$) a ser maior em vacas Brahman (21,3±0,3mm) do que Angus. O diâmetro máximo do CL foi similar ($P>0,10$) entre vacas Brahman e Senepol.

Fêmeas *Bos indicus* produzem dezenas de oócitos no único procedimento de aspiração folicular, numa relação direta com o número de folículos antrais visíveis pela ultrassonografia (PONTES et al., 2009). Esse fato leva o Brasil à liderança mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE) devido à dominância da genética zebuína. O número de oócitos recuperados por aspiração folicular é maior em fêmeas zebuínas (18- 25 oócitos; $P<0,05$; WATANABE et al., 1999; THIBIER et al., 2004) do que em taurinas (4 -14 oócitos por sessão de aspiração folicular; MARTINS JR et al., 2007). Vacas *Bos indicus* possuem maior número de oócitos por aspiração folicular (37,1±2,6; 15,4±1,2; $P<0,05$) e total de embriões (7,3±0,9; 1,1±0,2; $P<0,05$, respectivamente) que vacas *Bos taurus* (BARUSELLI et al., 2011). O total de oócitos (17,1±4,5; 11,4±3,9; 20,4±5,8 e 31,4±5,6), oócitos viáveis por OPU (12,1±3,9; 8,0±2,7; 16,8±5,0 e 24,3±4,7), número de embriões (3,2; 2,1; 3,9 e 5,5) e taxas de prenhez (40%, 36%, 37% e 37%) foi diferente ($P<0,01$) entre as raças Gir, Holandês (Hol), 1/4 Hol × 3/4 Gir e 1/2 Hol-Gir, respectivamente (PONTES et al., 2010).

O impacto no número e taxa de prenhez varia amplamente entre as raças. Pontes et al. (2011) mostraram que o número de prenhez em fêmeas Nelore com elevado número de

oócitos ($n= 78$) foi superior ($P<0,05$) ao baixo número de oócitos ($5,62\pm 0,54$ e $0,92\pm 0,13$, respectivamente). Porém, outro estudo mostrou que a taxa de prenhez na raça Nelore não foi diferente ($P\geq 0,05$) nas classes alta, intermediária e baixa CFA (30,0; 33,8 e 34,6, respectivamente; Morotti et al., 2015). Já Mossa et al. (2012) demonstraram que em fêmeas *taurus*, a taxa de prenhez no primeiro serviço na classe de CFA intermediária foi superior ($P<0,05$) a classe baixa (45 e 32%, $P<0,05$, respectivamente) e que a taxa de prenhez total em fêmeas com alta CFA foi maior ($P=0,06$) a baixa CFA (94 e 84%, respectivamente).

O conhecimento das diferenças entre zebuínos e taurinos, implica em melhores respostas a tratamentos hormonais e na utilização de técnicas de manejo. Essas particularidades na fisiologia reprodutiva são fundamentais para o correto emprego de biotecnologias da reprodução.

2.11 Técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum pick up* - OPU)

As primeiras realizações dessa técnica ocorreram na década de 80, onde os ovários eram manipulados via transretal e posicionados dorsolateralmente na cavidade abdominal e um transdutor linear com frequência de 3,5 MHz na pele, mais específico na região paralombar, de forma que fosse possível a visualização dos folículos e sua punção por meio de agulhas específicas (SENEDA et al., 2002).

A aspiração folicular era realizada utilizando apenas agulhas longas (55 cm), as quais foram substituídas por agulhas hipodérmicas descartáveis, na tentativa de facilitar a recuperação de oócitos (BOLS et al., 1995). A utilização de agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) e 50 mm de comprimento são mais viáveis na técnica. Agulhas que apresentem diâmetros maiores que 18G, permitem a obtenção de altas taxas de recuperação, porém, haverá mais oócitos desnudos, podendo causar detrimento no estroma ovariano e aumentar a quantidade de sangue no líquido aspirado. Agulhas que apresentem diâmetros menores que 19G podem causar atraso no processo de aspiração do líquido folicular (BOLS, 1997).

Na OPU é usado o sistema de bomba a vácuo, o qual permite a obtenção dos oócitos e líquido folicular para um tubo coletor para serem avaliados de acordo com sua morfologia e expansão das células do cumulus. Bols et al. (1995) demonstraram que a pressão de vácuo é outro fator que pode ser analisado no momento da aspiração folicular. Pressões maiores que 120mmHg, danificam a camada das células do cumulus e pressões menores, como 50 mmHg,

são ineficientes neste processo. Mostraram que há uma variação entre 40 a 400 mmHg (BOLS et al., 1996). As frequências também podem interferir na técnica. Hendriksen et al. (2004) mostraram que frequências entre 5 e 8 MHz são ideais e mais comumente utilizadas na técnica de aspiração folicular.

Os melhores resultados da técnica de aspiração folicular são obtidos a partir de diversos fatores, incluindo fatores técnicos e da quantidade de oócitos recuperados obtidos do total de folículos aspirados. Dentre estes fatores citam-se a visualização dos folículos pela US, também do diâmetro, bisel e corte da agulha, da bomba de aspiração a vácuo e da manipulação da técnica pelo operador. Além desses fatores, existe àqueles que podem estar relacionados à diversidade biológica dos animais. Dentre eles citam-se a frequência e momento da aspiração folicular, fisiologia, condição corporal, raça e idade da doadora. Estes são fundamentais nos resultados, interferindo na recuperação e no desenvolvimento embrionário (BOLS et al., 2005).

Posteriormente, Pieterse et al. (1988), descreveram a OPU, tornando viável o aproveitamento de oócitos de forma simples e inócua, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal. Alguns estudos demonstram que as aspirações podem causar efeitos deletérios na função ovariana (PETYIM et al., 2007), por outro lado, Aller et al. (2010) demonstram que repetidas aspirações no mesmo animal (com intervalo de três a quatro dias), não interfere na função ovariana e nem nos índices de gestação pós-aspiração.

Foi demonstrado que o número de folículos de 3 mm de diâmetro (tamanho médio para OPU) ou maiores é muito repetível ($r=0,95$) dentro dos indivíduos (BURNS et al., 2005). Diante disso, os melhores resultados são obtidos quando são aspirados folículos maiores que 3 mm. Em relação a quantidade de oócitos recuperados por OPU, demonstraram que fêmeas zebuínas da raça Nelore proporcionam maior número de oócitos recuperados (4,6 oócitos por sessão) por OPU em relação às fêmeas taurinas da raça Devon (16,3 oócitos por sessão) no total de 12 sessões (CRUZ et al., 2009). Além disso, doadoras não-lactantes apresentam maior percentual de desenvolvimento *in vitro* de blastocisto e produzem mais embriões por sessão OPU que vacas em lactação (VIEIRA et al., 2014a).

A aspiração folicular duas vezes por semana produz maior percentagem de embriões grau 1 e maior número de embriões transferíveis do que aspirações realizadas uma vez por semana (GIBBONS et al., 1994). Segundo Gonçalves et al. (2002), cada fêmea bovina é capaz de produzir 50 a 100 embriões/ano, com um regime de duas aspirações semanais por doadora, durante vários meses. Sabe-se que essa quantidade de aspirações é eficaz em animais

superovulados ou não, proporcionando assim, numa maior produção de embriões no menor período (De ROOVER et al., 2005; SENEDA et al., 2005).

As principais vantagens da técnica de OPU na PIVE é que não se faz necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos (BUENO; BELTRAN, 2008). Além de permitir aumentar o potencial de fêmeas de alto valor genético, bem como de animais portadores de infertilidade adquirida que estavam condenados ao abate por incapacidade de produzir descendentes. A associação destas técnicas possibilita a obtenção de até 18 gestações em apenas três meses (NIBART et al., 1995). Outras vantagens são que essa técnica pode ser aplicada em fêmeas gestantes, no pós-parto, acíclicas, com alterações patológicas do aparelho reprodutor localizadas na tuba uterina ou útero e naquelas que não respondem a superovulação (BONI, 2012).

O uso de hormônios também é eficaz no processo de OPU. Um estudo mostrou que a superestimulação de doadoras da raça Holandesa com FSH pituitário (p-FSH) antes da OPU aumenta a eficiência de PIVE com aumento da proporção de CCOs adequados para o cultivo, resultando em maiores taxas de blastocisto e produção de embriões por sessão de OPU. Garor et al. (2015) verificaram que a administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) na OPU é vantajosa sendo capaz de estender o tempo de cultivo *in vitro* do oócito em mulheres jovens com reserva ovariana normal.

Quando se compara às outras técnicas de reprodução, a associação de OPU e PIVE se sobressai, pois há a possibilidade da utilização de oócitos de animais *pós mortem* (HOSHI, 2003) e a intensificação do uso do sêmen, sendo capaz de produzir uma maior quantidade de embriões com sêmen sexado e com doses de animais de alto valor zootécnico (HAYAKAYWA et al., 2009). A aplicação dessa técnica também apresenta algumas limitações, como a baixa taxa de prenhez com a PIVE quando comparada com embriões produzidos *in vivo* (BONI et al., 2012).

2.12 Método de obtenção de oócitos

A obtenção de oócitos é uma das fases mais importantes do procedimento de produção de embriões. Pode-se ser realizada tanto *in vitro*, através da utilização de ovários provenientes de abatedouros locais, quanto *in vivo*, através de diversos procedimentos que foram evoluindo ao longo dos últimos anos (GONÇALVES et al., 2008).

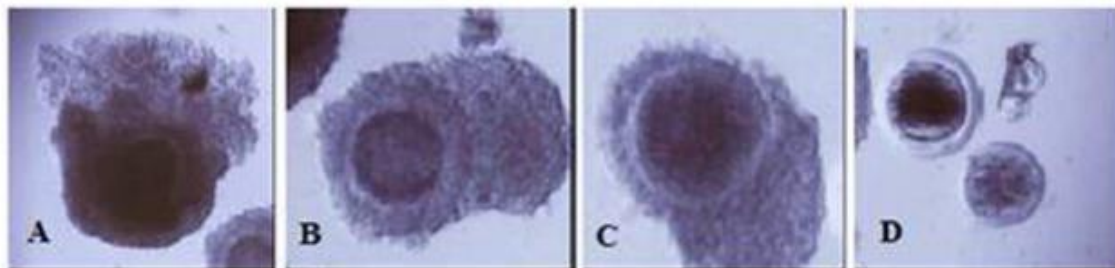
In vitro, é realizada a punção folicular com agulha acoplada a uma seringa ou bomba de vácuo, como citado anteriormente (GONÇALVES et al., 2002). Apesar de bastante utilizada com propósitos científicos e viabilizar o nascimento de um número expressivo de descendentes de doadoras, quando realizada de forma comercial, este procedimento apresenta algumas dificuldades, como: problemas durante o transporte dos oócitos do abatedouro ao laboratório, a falta de conhecimento sobre o estado de saúde e do padrão hormonal dos animais, assim como a impossibilidade de repetição da técnica para um mesmo animal (SENEDA et al., 2002). Desta forma, a obtenção de oócitos provenientes de animais vivos associada à US intensificou a obtenção de oócitos bovinos *in vivo* (BONI, 2012).

Durante o procedimento de aspiração, os ovários expostos e, eventualmente, porções uterinas devem ser constantemente umedecidas com solução de cloreto de sódio 0,9% e lavados ao término da aspiração com a solução de cloreto de sódio com 0,9% de DMSO e 0,2% de Heparina (BASSO et al., 2008).

A partir desta técnica pode ser realizada a seleção dos oócitos viáveis, utilizando o microscópio estereoscópico. Essa seleção é feita com base na morfologia oocitária, onde aqueles selecionados serão transportados até o laboratório onde se inicia as etapas de PIVE (GARCIA et al., 2004).

A seleção é baseada na visualização das camadas dos CCOs. A análise e seleção pode ser separada em quatro categorias, de acordo com as características baseadas na compactação e transparência das células do cumulus e homogeneidade e transparência do ooplasma, utilizando o sistema de classificação descrito por Stringfellow e Givens (2010). Consideram-se CCOs viáveis os de classificação I a III, sendo os CCOs de classe IV descartados. Grau I: Oócitos com cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; Grau II: Oócitos com cumulus parcialmente compacto em volta do oócito rodeando-o completamente. Com menos de três camadas de células do cumulus oophorus. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche todo espaço interior da zona pelúcida; Grau III: Oócitos que possuem o cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado; Grau IV: Oócitos desnudos sem células do cumulus, citoplasma com cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico. São selecionados os oócitos de grau I, II e III para a etapa de MIV (ver figura 1).

Figura 1 - Classificação de oócitos segundo Stringfellow; Givens (2010). A (Grau I), B (Grau II), C (Grau III) e D (Grau IV).



Fonte: Penitente-Filho et al., 2014.

2.13 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

2.13.1 Histórico e evolução da biotécnica

Nos mamíferos, ainda no final do século XIX, surgiu o primeiro relato sobre a possibilidade de se cultivar embriões *in vitro*. Alguns pesquisadores interessados realizaram estudos com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem a manipulação de embriões relacionados a técnicas associadas à reprodução e à produção de animais superiores. A FIV em animais iniciou em meados da década de 50, com o nascimento de um coelho gerado a partir dessa biotécnica. Tendo em vista que essa espécie apresenta características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do óvulo, o que facilita a manipulação e a ovulação induzida pelo acasalamento, é possível determinar de forma precisa a idade dos embriões (GONÇALVES et al., 2002).

No que se diz respeito aos animais de produção, apenas na década de 80 é que surgiram os primeiros relatos de sucesso de nascimentos na espécie bovina que ocorreu no Japão no ano de 1977, seguindo a metodologia de Brackett et al. (1982).

Essa técnica tem sido muito difundida e utilizada em diversos países, inclusive de forma destacada no Brasil, a partir da década de 90. Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 215 milhões de animais (IBGE, 2015). É o maior produtor mundial de bovinos, assumindo posição de destaque na produção mundial de embriões, particularmente pela expansão acentuada do uso da FIV em bovinos (MEIRELLES et al., 2008). Até o final da década de 90, a PIVE no Brasil foi realizada quase que exclusivamente para fins de pesquisas e, conseqüentemente, não teve impacto comercial (VIANA et al., 2012). Devido à sua complexidade e características de altos custos era esperado um crescimento lento, apenas para atender as demandas de mercados específicos

(PONTES et al., 2010). Nesse mesmo contexto, esta biotécnica associada à OPU vem sendo cada vez mais acessível e eficiente, podendo provocar grandes evoluções no cenário nacional da indústria de embriões (SENEDA et al., 2002).

O contínuo e expressivo aumento da PIVE sustentada principalmente pelas raças zebuínas de corte devido a melhor qualidade, maior potencial dos oócitos recuperados e maior número de folículos disponíveis para aspiração nos ovários dessas doadoras, o Brasil chegou a produzir em média 97,3% dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no país (VIANA et al., 2012).

Às dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios utilizados são barreiras técnicas a serem rompidas. A partir do início do século XX, novas condições básicas de cultura, pode permitir a melhoria na produção de embriões *in vitro*. A partir disso, a produção de meios de qualidade superior mostrou progressos significativos e com profundos reflexos no sucesso da coleta e cultivo de embriões. Na década de 50, foi proposta a nova formulação para os meios de cultura, que passaria a ser utilizado na coleta e no cultivo dos embriões, ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso. Desta forma, desenvolveu-se um meio utilizando uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, o qual foi capaz de promover as clivagens de um embrião de camundongo com uma célula até o estágio de blastocisto. Após alguns anos, foi realizada uma pesquisa para determinar quais as necessidades nutricionais de um embrião em meio de cultura e, durante o processo, desenvolveu a técnica da cultura de embriões em microgotas. Essa técnica se mantém até os dias atuais em vários laboratórios na área animal (ANDREOTTI, 2007).

Outros fatos que marcaram o sucesso da PIVE nessa década foi o desenvolvimento do fluido sintético de oviduto (SOF; GANDHI et al., 2000), um meio de produção que simula as condições fisiológicas da fêmea, o meio Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP), utilizado na etapa de FIV (BAVISTER; YANAGIMACHI, 1977), e fatores para a capacitação espermática mediante o uso de cálcio (SINGH et al., 1978).

2.13.2 Meios de cultivo para PIVE

Os baixos resultados da PIVE podem ser atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (RUSSELL et al., 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (CAMARGO et al., 2006).

Referente às condições de cultivo, osmolaridade, nutrientes proteicos e energéticos, atmosfera e o pH são os principais fatores que devem ser controlados durante a PIVE, visando manter as condições semelhantes do ambiente folicular *in vivo*.

Fator importante para se obter bons resultados na PIVE com relação à quantidade e qualidade dos embriões é o pH das soluções. O pH é fundamental para promover a eficiência de reações bioquímicas que envolvem o equilíbrio ácido-básico, influenciando assim, a produção de blastocistos. O uso de sistemas tampões em meio de cultivo é necessário para minimizar possíveis variações do pH do meio, que deve permanecer entre 7,3 e 7,5 durante a PIVE (VAJTA et al., 1997). Variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem inviabilizar o crescimento celular e resultar na diminuição dos índices de fecundação e produção de blastocistos.

O sistema tampão empregado na PIVE irá depender da atmosfera controlada, que geralmente é realizada sob as condições com 5% CO₂ em ar atmosférico, utilizando-se meio tamponado com bicarbonato de sódio para manutenção do pH em 7,4. Por outro lado, quando oócitos ou embriões são manipulados em ar atmosférico, a utilização do HEPES N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid) mantém o pH de maneira eficiente e mais constante do que a apenas a utilização de bicarbonato. O HEPES é um tampão orgânico solúvel em água, com dificuldade para passar pela membrana celular, não forma complexos com substâncias biológicas, possui baixa toxicidade, estabilidade e ação inibidora em reações bioquímicas. Sabe-se ainda que o HEPES pode ser tóxico e causar rompimento da membrana celular nas primeiras divisões do embrião, com isso, muitos pesquisadores usam meios livres de HEPES para oócitos e embriões em ar atmosférico, preferindo-se o uso de bicarbonato (MORGIA et al., 2006).

Diferentes meios são utilizados para a PIVE, tais como SOF (GANDHI et al., 2000), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Ham's F-10, Ham's F-12 (SMETANINA et al., 2000) e *tissue culture medium* 199 (TCM-199). Para bovinos, o TCM-199 vêm sendo o meio mais apropriado ao processo de MIV (GORDON, 1994). Esse meio é indispensável ao metabolismo celular do oócito, porém, não é específico para fornecer as necessidades complexas e dinâmicas dos CCOs durante a MIV. Desta forma, há a necessidade da formulação de meios específicos, principalmente através da inclusão de aditivos e suplementos para melhoria da qualidade dos oócitos na MIV.

As fontes proteicas mais utilizadas como suplemento do meio de cultivo para MIV em bovinos são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI et al., 2002). O SFB possui componentes que melhoram o desenvolvimento embrionário, como

fatores de crescimento, quelantes de metais pesados, além de componentes que estimulam a expansão das células do cumulus (ABE; HOSHI, 2003). Outra suplemento proteico semi-definido utilizado é o BSA. Um estudo comprovou que a adição da BSA nos meios de cultivo intensifica as taxas de blastocistos e promove criotolerância satisfatórias (GÓMEZ et al., 2008). No entanto, alguns estudos demonstraram a desvantagem da utilização de fontes de origem animal nos meios, pois esses podem ser veículos para agentes infecciosos e tóxicos para o oócito e embrião (THOMPSON et al., 1995). Ainda entre outras desvantagens, observa-se que geralmente embriões cultivados com meio semi-definido contendo soro e/ou BSA acumulam lipídeos, o que dificulta a técnica de criopreservação (ABE et al., 2002; GÓMEZ et al., 2008). Além disso, ocasionam alterações na ultraestrutura, compactação e blastulação embrionária, podendo aumentar a incidência de natimortos e mortalidade após o nascimento (ABE et al., 1999).

Devido a esses fatores, muitos estudos indicam a utilização de meios quimicamente definidos na ausência de soro e/ou BSA, substituindo-os por aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e surfactante, porém, produzem baixas taxas de blastocistos viáveis (ALI; SIRARD, 2002; ITOH et al., 2002; THOMAS et al., 2003; KORHONEN et al., 2010).

A combinação entre o BSA e SFB na maturação possibilitou a obtenção de adequadas taxas de maturação oocitária, sendo interessante pelo fato de que a concentração do SFB pode ser reduzida pela metade quando esse composto está associado. Em vista disso, é esperado que ocorra menor acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas nesses oócitos, o que pode ser refletido na melhoria da criosobrevivência dos embriões produzidos (COLLADO et al., 2014).

Fontes hormonais como o LH e o FSH no meio de MIV promovem melhoria na expansão dos CCOs (YOUNIS; BRACKETT, 1992). O FSH estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas, que induzem à retomada da meiose, a expansão do cumulus e, portanto, facilitam a fertilização. Alta concentração de FSH (20µg/mL) adicionada ao meio de MIV promoveu maior taxa de blastocistos (19,5%) comparada ao grupo controle - sem FSH (13,4%) (PALMA; CLEMENT-SENGEWALD; KREFFT, 1993). Um sistema de cultivo com baixa concentração de FSH (0,01 UI/mL) e 10% de SFB utilizado durante a MIV reduziu as taxas de clivagem e de blastocistos nos dias 7 e 8 de cultivo (GUIMARÃES et al., 2015).

A suplementação do meio de MIV com fatores de crescimento e vitaminas também são favoráveis. Proteínas com peso molecular inferior a 30.000, diferente dos hormônios, são sintetizados por vários tecidos e órgãos. Possuem ação endócrina, parácrina e autócrina, não

se armazenam na célula, pois são liberados logo após a síntese. Esses fatores possuem ação mitogênica estimuladora do desenvolvimento e crescimento de células e tecido, em resposta a mensageiros bioquímicos, e sua comunicação com seus receptores estimulam o processo de competência oocitária final melhorando a PIVE. Os principais fatores de crescimento utilizados em meios são: fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), Kit ligante (KL), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento e transformação (TGF), fator derivado do desenvolvimento das plaquetas (PDGF), dentre outros (GONÇALVES et al., 2007). Referente ao uso de vitaminas, Gomes et al. (2012) observaram que a adição de 0,3 μM de retinol ou 0,5 μM de ácido retinoico no meio de cultivo MIV melhora a fase final da maturação nuclear de oócitos caprinos. A suplementação do meio de MIV com os antioxidantes (2 μM de quercetina ou 100 μM de cisteamina) aumenta as taxas de produção de blastocistos (GUEMRA et al., 2013).

O bloqueio da meiose pode ser obtido com o uso de estabilização farmacológica ou com inibidores fisiológicos. Estudo avaliou os efeitos dos inibidores da MIV durante três e cinco dias de pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário. Esses inibem especificamente a fosforilação de proteínas CDKs, como o Fator inibidor da maturação (Roscovitina) e a Butirolactona I (FARGHALY et al., 2011; ADONA et al., 2008). A combinação de Roscovitina, o inibidor da fosfodiesterase-3 (Cilostamida) e ativador do adenilato ciclase (Forskolina) melhorou as taxas de maturação (91%; 96%) e fertilização (40%; 46%) por três e cinco dias respectivamente comparada com o controle (77% e 20%; $P < 0,05$; FARGHALY et al., 2011).

A PIVE é uma biotécnica que há poucos anos vêm se destacando e permitindo sucesso na reprodução de animais geneticamente superiores. Essa técnica pode ser dividida de acordo com as etapas de obtenção e preparação dos oócitos, a Maturação *in vitro* (MIV), seguida da Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* de embriões (CIVE).

2.14 Maturação oocitária

A produtividade e a longevidade da vida reprodutiva das fêmeas são influenciadas por fatores como idade, puberdade, condições reprodutivas, raça e a composição genética (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). A competência reprodutiva do animal é uma das

características de maior impacto econômico em todo o processo de produção (RADOSTITS, 2001).

A capacidade de desenvolvimento oocitário pode ser influenciada pelas condições fisiológicas da doadora, tais como estágio do ciclo estral, estágio do desenvolvimento folicular, dentre outros (LONERGAN; FAIR, 2008). Apesar de muitos fatores serem desconhecidos, deve-se considerar que o desenvolvimento oocitário dentro do folículo é controlado por fatores endócrinos e locais, como hormônios, fatores de crescimento e peptídeos.

Assim, as condições de CIV para que ocorram os processos de maturação nuclear e citoplasmática do oócito têm a etapa determinante na aquisição da competência, essencial para o desenvolvimento embrionário. Portanto, para o estabelecimento de um sistema de cultivo que possibilite a produção do maior número de embriões de boa qualidade, é necessária a compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação de oócitos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Durante a MIV, oócitos sofrem diversas mudanças em nível molecular e estrutural, para que a maturação ocorra com sucesso. *In vitro*, a retomada da meiose ocorre de forma abrupta e espontaneamente, independente da competência adquirida. Dessa forma, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena competência (ADONA; LEAL, 2006; GILCHRIST; THOMPSON, 2007), ou seja, ainda não adquiriram a competência citoplasmática para suportar o desenvolvimento (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). A maturação inadequada, quer seja do núcleo ou do citoplasma, impossibilita a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário. Com a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática, o oócito se torna apto a permitir o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial (MINGOTI, 2005).

Apesar de independentes, as maturações molecular, nuclear e citoplasmática interagem e, *in vivo*, ocorrem simultaneamente em determinados momentos garantindo a plena capacitação do oócito (FERREIRA et al., 2008; YAMADA; ISAJI, 2011).

2.14.1 Maturação *in vivo*

Na fase de maturação, o oócito torna-se competente para o reinício da meiose, fecundação e, subsequente, desenvolvimento embrionário até a ativação do seu genoma (SIRARD et al., 2007). A maturação ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos

foliculares visto que o desenvolvimento do folículo e do oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (SILVA et al., 2016).

Na maioria dos mamíferos, o oócito entra nos estágios iniciais da meiose durante a vida fetal e torna-se quiescente na fase de diplóteno da prófase I até que se tornem aptos a ovulação ou atresia (LONERGAN; FAIR, 2015). Em vacas, por volta de 72-82 dias de gestação, alguns oócitos do feto já iniciam a primeira prófase meiótica, passando pelos estágios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, no qual ocorre a primeira parada da meiose, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (VG) (RICHARDS, 1980).

Oócitos adquirem competência meiótica durante o estágio de VG através de uma intensa atividade transcricional, na qual estocam RNAm para estágios posteriores ao pico pré-ovulatório de LH, tais como retomada da meiose, fecundação e embriogênese (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Em bovinos, a ativação do genoma embrionário acontece relativamente tarde, durante o estágio de quatro células (MEMILI; FIRST, 1999). Assim, o oócito é o principal responsável por assegurar o desenvolvimento embrionário inicial, principalmente devido à presença de grande quantidade de RNAs mensageiros e proteínas que foram acumulados durante crescimento do oócito (FAIR et al., 2007, HAMATANI et al., 2008).

2.14.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação de oócitos, preparando-os para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2008). A MIV envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas no oócito. O oócito imaturo (oócito primário) se encontra parado no estágio de prófase da primeira divisão meiótica (RHEINGANTZ, 2007) até que se atinja o estágio de maturação oocitária. Alguns estudos demonstram que a baixa quantidade de camadas de células do cumulus ao redor do oócito dificulta a competência *in vitro* durante a maturação (SARAIWA et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2011). Cecconi et al. (2008) reportaram que células do cumulus secretam fatores capazes de ativar a via de sinalização da maturação meiótica. Essa ativação não ocorre quando os oócitos são retirados de folículos antrais pequenos (< 3 mm) imaturos.

Durante o processo de MIV ocorre a participação de fatores secretados pelo oócito, como o GDF-9 e a BMP-15, que modulam a expansão das células do cumulus, além da

regulação da expressão de genes para cicloxigenase 2 (COX-2) e hialuronidase sintetase -2 (HAS-2) que por sua vez, regulam a expansão do cumulus, sendo importantes na integração para coordenar a competência de desenvolvimento oocitário (YOSHINO et al., 2006; DRAGOVIC et al., 2007).

Enquanto oócitos para a PIVE são obtidos de folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro e demorariam de 4 a 10 dias para a posterior ovulação, *in vivo*, recomeçam a meiose com 15 mm de diâmetro (PAVLOK et al., 1992). Em adição, o período de MIV é de 24 horas, e o folículo dominante tem a capacidade de crescer rapidamente de 4 a 15 mm por aproximadamente cinco dias (FAIR et al., 1996). Outras evidências demonstram que o potencial de desenvolvimento do oócito pode ser influenciado pelas condições fisiológicas da doadora, tais como estágio do ciclo estral, estágio do desenvolvimento folicular, dentre outros (LONERGAN; FAIR, 2008).

A maturação do oócito é caracterizada pela progressão do desenvolvimento do estágio de vesícula germinativa ao de metáfase II. A retomada incompleta da meiose I ou fracasso para completar o ciclo celular resulta em maturação do oócito incompleta ou anormal. Cromossomos desalinhados e defeitos do eixo são alguns dos problemas ocasionados na formação do fuso, além da incapacidade na completa extrusão do primeiro corpúsculo polar (DAI et al., 2014).

Para entender a importância da qualidade da maturação do oócito para o posterior desenvolvimento ao estágio embrionário é fundamental que sejam bem especificadas as distintas formas de competência assumida pelo oócito durante o processo de maturação. Essas formas podem ocorrer basicamente em três diferentes processos: os eventos moleculares, citoplasmáticos e nucleares (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Alterações no oócito ocorrem tanto no núcleo como no citoplasma, mas de forma independente, de tal forma que não ache interferência entre os processos, garantindo assim, um desenvolvimento celular produtivo (FERREIRA, 2010). Nesse sentido, no processo de MIV, o oócito sofre alterações que irão ser discutidas a seguir.

2.14.1.1 Maturação molecular

A maturação molecular corresponde às fases de crescimento e maturação do oócito, e é assim definida por se tratar da transcrição, armazenamento e processamento do RNAm

expressos pelos cromossomos (FERREIRA et al., 2008), que serão, em seguida, traduzidos em proteínas pelos ribossomos.

As proteínas derivadas desses RNAs estão envolvidas tanto na maturação, quanto nos eventos celulares subsequentes: fertilização, formação de pró-núcleos e embriogênese inicial, devendo, portanto, ser estocadas até sua utilização. A transcrição, o estoque de RNA e proteínas ocorre durante o crescimento folicular e cessa quando há a quebra da vesícula germinativa (GVDB) com a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos se tornam condensados e inativos (SIRARD, 2001).

O oócito é o principal responsável por coordenar os RNAs e as proteínas que foram acumuladas durante a sua fase de crescimento (FAIR et al., 2007; HAMATANI, et al., 2008). O perfil transcricional de oócitos bovinos maturados *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado vias distintas e variações no número de genes, o que pode alterar o desenvolvimento embrionário após a fertilização (KATZ-JAFFE et al., 2009; MAMO et al., 2011).

Dois eventos moleculares desta fase são cruciais para uma transição adequada do oócito para embrião. A Proteína quinase ativada por mitógenos (MBK-2-quinase), coordenador chave para a transição do oócito para embrião é ativado, após o fim da meiose I, e não devido a entrada de espermatozoide. Após a ativação, a fosforilação de MBK-2 de diversos substratos durante a meiose II é crítica na coordenação da transição oócito para embrião (CHENG et al., 2009).

2.14.1.2 Maturação nuclear

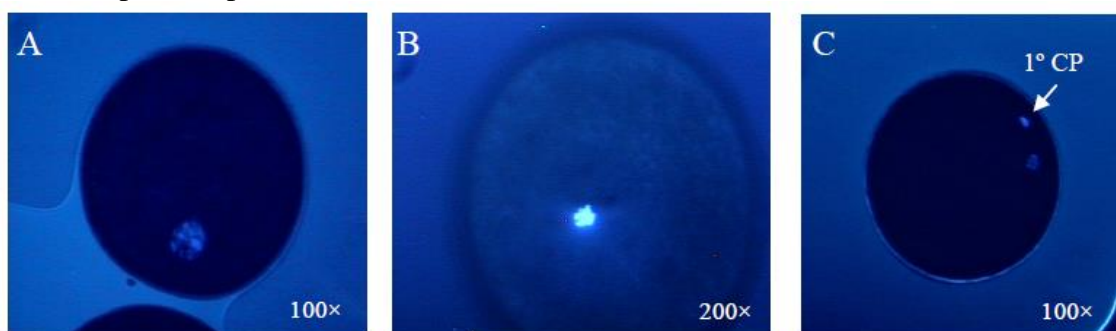
A completa maturação nuclear é marcada pela expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação da segunda placa metafásica (oócito maturo). Os oócitos então maturados apresentam-se na fase de metáfase II com os cromossomos alinhados em plano equatorial por ação do fuso meiótico. Nesta fase ocorre a quebra da vesícula germinativa, seguida por condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo, desintegração do núcleo e formação do fuso (GONÇALVES et al., 2008; CHAVES et al., 2010).

Os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que, metade do número original de cromossomos permanece no oócito (célula haploide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior denominada oócito secundário. Após a

maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (MII) até a fecundação (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A maturação nuclear nos animais *in vivo* se inicia após o pico pré-ovulatório de LH, enquanto que *in vitro*, é iniciada após a remoção do oócito do interior do folículo. A maturação nuclear em bovinos inicia-se com a retomada da meiose. O rompimento da vesícula germinativa ocorre entre 8 e 12 horas, a metáfase I de 10-15 horas, a anáfase I de 15-16 horas, a telófase I de 16-18 horas e a metáfase II de 18-24 horas após o pico de LH ou após a retirada do oócito do ambiente folicular (SIRARD et al., 1989, ver figura 2). Da mesma forma, Wehrend e Meinecke (2001) observaram períodos próximos ao descrito anteriormente. Por esta razão, o tempo de cultivo mais utilizado para MIV é de 24 horas para fim entender as etapas da meiose e observar alterações do ciclo celular e meiose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Oócitos bovinos maturados por 18 horas resultaram em taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário semelhantes às observadas em oócitos maturados por 24 horas. Desta forma, o tempo de maturação não deve ultrapassar 24 horas, já que oócitos maturados por 32 horas apresentaram expressiva redução no desenvolvimento embrionário após a FIV, demonstrando o efeito prejudicial do envelhecimento oocitário sobre as taxas de produção embrionária (GORDON, 1994).

Figura 2 - Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscópio de epifluorescência. A) Oócitos em VG: cromossomos descondensados; B) Oócitos em metáfase I: cromossomos altamente condensados. C) Oócitos em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e primeiro corpúsculo polar (1° CP).



Fonte: Gottardi e Mingoti (2009).

A maturação nuclear de oócitos é regulada por fatores presentes no fluido folicular, e a sua interação com as células foliculares é determinada por gonadotrofinas (KIM et al., 2008). Oócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem capacidade de quebra da vesícula germinativa apenas quando atingem um determinado diâmetro de acordo com a

espécie (maior que 110 μm para ruminantes; FAIR et al., 1995). De acordo com Cecconi et al. (2008), oócitos com baixa qualidade, paralisam seu processo de desenvolvimento durante as fases iniciais e intermediárias da meiose, causando prejuízos durante a maturação nuclear.

A fim de analisar a competência meiótica do oócito, um estudo isolou CCOs de folículos antrais inicial de 0,4 e 0,8mm de diâmetro e cultivou por 0, 7 e 14 dias. A porcentagem de oócitos com uma configuração meiótica imatura diminuiu com o tempo de cultivo, sendo 96,7; 72,5 e 35,4%, respectivamente para o dia 0, 7 e 14 de cultivo. Os resultados demonstraram que os CCOs cultivados por 14 dias devem estar mais adaptados ao desenvolvimento devido à diminuição do metabolismo energético e maturação nuclear ser mais lenta, porém, resultou em degeneração oocitária (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2011).

Por outro lado, Ulloa et al. (2014) sugerem que os processos epigenéticos no desenvolvimento do embrião são influenciados por protocolos de MIV e sistema de recuperação de oócitos e que a adição de moduladores de AMPc em conjunto com o maior tempo de MIV pode influenciar de forma positiva na qualidade do embrião, provavelmente associada a maiores níveis de AMPc em oócitos e células circundantes.

2.13.1.3 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito passa a se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Tais alterações estão envolvidas na redistribuição das organelas celulares, como os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (ANGUITA et al., 2007). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na competência do oócito ainda não são bem descritos. Gilbert et al. (2012) demonstraram que para ter sucesso na eficácia da maturação *in vitro*, é importante ocorrer a maturação citoplasmática antes do final da maturação nuclear.

A maioria dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) presentes no oócito é sintetizada e acumulada durante o período de crescimento oocitário (De SOUSA et al., 1998). Até que a transcrição do DNA do embrião se torne ativa (evento esse que ocorre após a transição materno-zigótica), o desenvolvimento do oócito, zigoto e embrião com menos de 16 células dependem do “*pool*” de RNAm e das proteínas acumuladas para suportar todas as

modificações bioquímicas, moleculares e estruturais do oócito que ocorrem durante a maturação (LONERGAN et al., 2003).

Os CCOs retirados de folículos antrais e cultivados *in vitro* retomam a meiose espontaneamente, mesmo na falta de hormônios (PINCUS; ENZMANN, 1935), provavelmente através da remoção do fator inibitório presente no folículo. Sugere-se que o inibidor da maturação oocitária (IMO) produzido pelas células da granulosa/teca é um polipeptídeo presente no fluido folicular de ovários da maioria dos mamíferos. Desta forma, sugere-se que o IMO é um dos fatores que impedem o oócito de sofrer maturação meiótica espontânea *in vivo* (SIRARD et al., 1998).

Durante a maturação citoplasmática, a atividade das cinases inicia-se através da complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica. As quinases dependentes de ciclinas (DCKs) são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1). Exemplos importantes de cinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK; MOTLIK et al., 1998).

Outro grupo de proteínas que estão envolvidas na progressão da meiose são as MAPKs, pertencentes à família das serina/treonina cinases (KUBELKA et al., 2000). Essas proteínas são ativadas por sinais extracelulares durante a maturação meiótica em oócitos de vertebrados. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após oito horas de cultivo *in vitro* e apresenta um aumento gradual até 12–14 horas, mantendo-se estável até o final da maturação, após a ativação de suas isoformas (ERK1/2) com a proximidade do rompimento da VG em oócitos bovinos (KUBELKA et al., 2000). Esse fato sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG (LEFEBVRE et al., 2002). O ATP também aumenta nos oócitos durante o início (estágio de GV) e o final da MII da MIV (BREVINI et al., 2007). Desta forma, grandes concentrações de ATP estão correlacionadas a maior taxa de produção de embriões após a FIV (STOJKOVIC et al., 2001).

O fator promotor de ativação (MPF) é uma quinase envolvida na divisão celular. Desta forma, a ativação do MPF também está envolvida na retomada da meiose nos oócitos e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas (EPPIG et al., 1996). É um dos principais reguladores das alterações que ocorrem no processo de maturação oocitária, coordenando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (KIM et al., 2000; KRISCHEK; MEINECKE, 2002; LEFEBVRE et al., 2002).

Durante a maturação, os oócitos sofrem uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas que os preparam para a fertilização, como mudanças no citoplasma, redistribuição das organelas, aumento no número e mudança na morfologia de organelas, formação de gotículas lipídicas, redução do número de complexo de Golgi e alinhamento dos grânulos corticais (CHAVES, 2010). A idade reprodutiva está correlacionada negativamente com atividade mitocondrial em oócitos, com distribuição mitocondrial mais homogênea durante a maturação *in vitro* (WILDING et al., 2001).

2.15 Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV é elucidada pela capacidade dos espermatozoides de se unir a zona pelúcida dos oócitos e de fecundá-los. A etapa de FIV depende da qualidade dos oócitos e dos espermatozoides utilizados (CARVALHO NETO, 2009) e através da capacitação espermática através da remoção de proteínas e outras substâncias de capacitantes presentes no plasma seminal. Desta forma, as células espermáticas ficam hiperativadas e se unem as proteínas específicas da zona pelúcida dos oócitos, dando início à reação acrossômica (FLORMAN; FIRST, 1988).

Os espermatozoides deverão passar pelo processo de capacitação que envolve alterações na membrana plasmática, os quais fazem com que se torne instável. A capacitação espermática em bovinos ocorre no oviduto é promovida pela heparina, um glicosaminoglicano presente em altas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (BLONDIN et al., 2009).

A entrada do espermatozoide ativa muitos outros eventos, incluindo o bloqueio da polispermia, a liberação da vesícula cortical, fluxos de cálcio, e a segunda divisão meiótica (MARCELLO et al., 2013).

De acordo com Varago et al. (2008) o co-cultivo de espermatozoides com oócitos é realizado por um período de 18 a 22h, isso irá depender da rotina do laboratório. Com temperatura de 38,7°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O meio base mais utilizado é o Tyrode-albumina-lactato-piruvato (FERT-TALP).

Alguns trabalhos mostram que as altas taxas de FIV foram atingidas por adição de heparina (BRACKETT; ZUELKE, 1993) ou a sua combinação com a penicilamina, hipotaurina e epinefrina, cálcio ionóforo A23187 com ou sem cafeína e alta força iônica (BRACKETT et al., 1982).

2.15.1 Escolha do sêmen

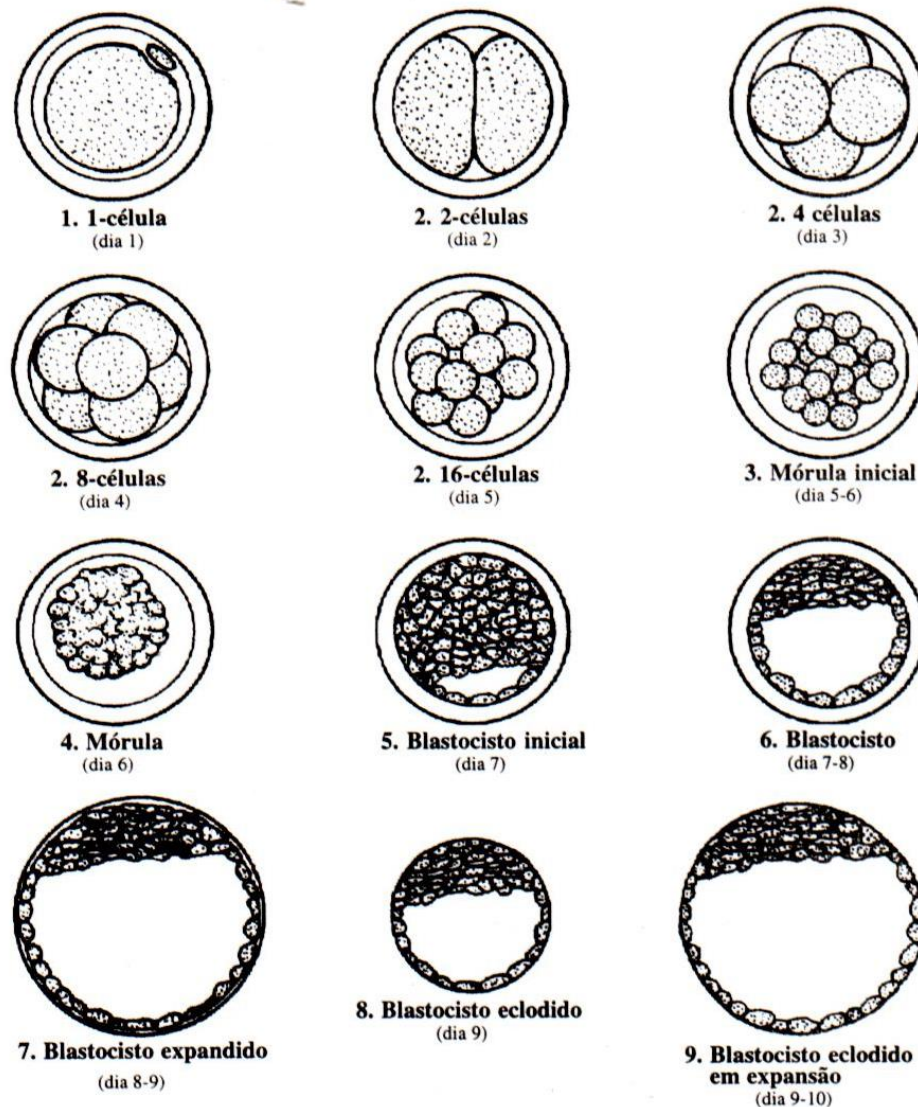
O uso de um sêmen sexado na PIVE permite a melhoria da qualidade do rebanho e reduz o número de animais que o integram, a fim de ter uma proporção ideal de machos e fêmeas (OSES et al., 2009).

Após o descongelamento da palheta de sêmen, isto é, antes da capacitação espermática, os espermatozoides viáveis devem ser separados do plasma seminal, dos crioprotetores e das células mortas (GONÇALVES et al., 2008). Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de percoll e o swim up (GALLI; LAZZARI, 1996). Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração de 1 a 5 x 10⁶ sptz/ml de meio (GONÇALVES et al., 2008).

2.16 Cultivo *in vitro* de embriões (CIVE)

O CIVE visa o desenvolvimento do estágio embrionário inicial até a fase de blastocisto, passando pelos estágios de mórula, blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BE), blastocisto eclodido (Ver figura 3). Para que ocorra esse desenvolvimento, se faz necessária sucessivas clivagens até a chegada ao estágio de blastocisto, que dura em média de 7 a 8 dias após a FIV. Após isso, é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para serem transferidos a uma receptora ou para serem criopreservados (GONÇALVES et al., 2008).

Figura 3 - Esquema de desenvolvimento embrionário.



Fonte: IETS, 2014.

De acordo com Majumder et al. (2010), os embriões podem ser classificados de acordo com diferenças no tamanho dos blastômeros em graus 1 - 4 (grau 4: blastômeros de tamanho igual; grau 3: < 20% de diferença no tamanho dos blastômeros; grau 2: 20-50% diferença no tamanho dos blastômeros e grau 1: > 50% de diferença no tamanho dos blastômeros).

A escolha de embriões com maior potencial de desenvolvimento é um passo chave para aumentar o percentual de produção *in vitro* de embriões. A técnica possui capacidade não-invasiva e confiável e têm o potencial para desenvolver até o estágio de blastocisto e chegar a serem transferidos (PERKEL et al., 2015). Assim, embriões de alta qualidade selecionados com base na morfologia ainda podem demonstrar defeitos genéticos ou epigenéticos

indetectáveis que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento de um embrião (NEL-THEMAAT; NAGY, 2011).

Apesar dos avanços na PIVE nos programas de melhoramento genético bovino, a quantidade de embriões produzidos que atingem até o estágio de blastocisto é, em média de 40% sendo que, comercialmente, a taxa de blastocisto pode variar de 20 a 50% com média 25 e 35% (GONÇALVES et al., 2007). Além disso, os embriões PIV possuem menor viabilidade e menor resistência à vitrificação em relação a transferência de embrião (TE) convencional (GALLI; LAZZARI, 1996).

Eficiência de múltiplas ovulações durante a produção de embriões *in vivo* diminuiu durante as estações quentes, tanto em vacas e novilhas; no entanto, a queda foi mais acentuada nas vacas doadoras (VIEIRA et al., 2014b).

Uma variedade de fatores endógenos e exógenos estão associados às condições de cultivo *in vitro* podendo encaminhar os embriões ao estado de senescência ou morte por apoptose. Embriões bovinos e humanos em estado de senescência são metabolicamente ativos, e não demonstram nenhuma alteração morfológica, bioquímica ou molecular de apoptose antes da fase de 8 células. Essa senescência ocorre no início da clivagem com falha no desenvolvimento embrionário e a apoptose ocorre após a fase de 8 células (BETTS; MADAN, 2008).

Alguns genes estão envolvidos durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões. O gene Msh homeobox 1 (MSX1), fator de transcrição codificado, é altamente expresso em oócitos em estágio de vesícula germinativa, menos em oócitos em metáfase II e embriões (TESFAYE et al., 2010). O MSX1 é necessário para a regulação do crescimento celular, a proliferação, a diferenciação e a comunicação célula-célula durante a fase de pré-implantação do embrião. A supressão deste gene em oócitos em fase de vesícula germinativa, através da ação de RNAs interferentes (RNAsi), impede embriões bovinos pré-implantados de alcançar a fase de 8 células e blastocisto. Além disso, altera a expressão de outros genes na fase de 8 células estão envolvidos na atividade do fator de transcrição, atividades de ligação e catalíticas (TESFAYE et al., 2010).

De acordo com Fischer; Bavister (1993), a concentração de oxigênio no lúmen do trato reprodutor feminino está entre 3 e 7%. Portanto, os embriões bovinos cultivados *in vitro* sob uma concentração atmosférica com baixo O₂ (5%) possuem taxas de desenvolvimento mais elevados do que os cultivados com 20% de O₂ (TAKAHASHI et al., 2000). Isso indica que a alta concentração de O₂ reduz a capacidade de desenvolvimento, o que pode resultar no aumento da acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma de embriões

em desenvolvimento (GOTO et al., 1993). O estresse oxidativo reduz a qualidade do embrião e a viabilidade devido à peroxidação de lipídios da membrana e mudança de proteínas e ácidos nucleicos, o que resulta em morte celular por apoptose (VAN SOOM et al., 2002). O embrião é submetido a estresse oxidativo, quando a produção de ROS é maior do que a capacidade de células para produzir antioxidantes (DROGE, 2002). Portanto, o equilíbrio entre as ROS e a presença de antioxidantes é determinante para o sucesso do desenvolvimento embrionário (de LAMIRANDE et al., 1997). O ácido ascórbico (vitamina C) é solúvel em água e pode ser utilizado como antioxidante mais importante nos fluidos extracelulares e atua na proteção do DNA exógeno durante a oxidação (ROSE; BODE, 1993; FRAGA et al., 1991).

O CIVE varia de 7 a 9 dias, numa temperatura de 38,7°C, 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ em ar e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia após a fecundação, quando são transferidos. Sendo que os blastocistos podem permanecer na estufa até o 9º dia para avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

2.17 Técnicas de avaliação da viabilidade e ultraestrutura de folículos, oócitos e embriões cultivados *in vitro*

Com a finalidade de se avaliar mudanças morfo-fisiológicas e ultraestruturais ocorridas nos folículos, oócitos e embriões, diferentes técnicas de avaliação oocitária e embrionária antes e após a maturação oocitária e cultivo *in vitro* de embriões podem ser utilizadas. Dentre as técnicas disponíveis, destacam-se a histologia clássica para quantificar e identificar a reserva folicular, além daquelas que permitem a avaliação das etapas de desenvolvimento oocitário e embrionário, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de fluorescência. A seguir, será abordada brevemente cada uma dessas técnicas.

2.17.1 Histologia clássica

A histologia clássica compreende as etapas de fixação, desidratação, diafanização ou clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas. Ao término desse processo, é possível observar sob microscópio óptico tanto folículos isolados como aqueles inclusos no córtex ovariano. Essa técnica constitui, portanto, uma importante ferramenta para avaliar a morfologia de folículos pré-antrais frescos, criopreservados e/ou cultivados *in vitro*.

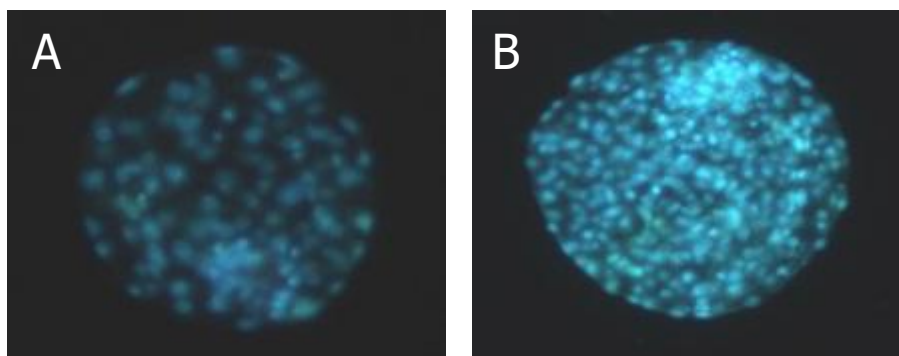
Através da análise das lâminas obtidas, é possível identificar o processo de ativação folicular, observar o crescimento folicular e oocitário e a manutenção da morfologia folicular normal de forma quantitativa (MATOS et al., 2007). No entanto, quando se deseja avaliar a qualidade do folículo, recomenda-se utilizar a histologia clássica associada a outras técnicas mais sofisticadas, como, por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão, que permite avaliar com precisão a integridade das membranas celulares, bem como as características de importantes organelas citoplasmáticas.

2.17.2 Microscopia de fluorescência

Uma técnica também bastante utilizada para avaliar a viabilidade oocitária após a MIV e CIVE é a microscopia de fluorescência. A técnica baseia-se em marcadores fluorescentes que, quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A microscopia de fluorescência vem sendo comumente adotada para análise de oócitos após a MIV (MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012).

Os oócitos analisados por fluorescência podem ser utilizados pelo fluoróforo Hoescht 33342. Os sinais de fluorescência emitidos de Hoechst 33342 foram coletados em 568 nm. Esse marcador penetra nas células e se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA e marca a cromatina, permitindo assim a avaliação do estágio meiótico oocitário (MATOS et al., 2007). A coloração com Hoechst 33342 é bastante utilizado para avaliação da MIV de oócitos e para a contagem do número de células embrionárias (GUEMRA et al., 2013, ver figura 4).

Figura 4 - Coloração com Hoechst 33342 para avaliação do número de células embrionárias (A) embrião com ± 110 células (B) embrião com ± 360 células.



Fonte: Adaptado de Guemra et al., 2013.

Além desse marcador, existe a calceína acetoximetil (calceína-AM) e o etídio homodímero-1 (EthD-1), que detectam células vivas e mortas marcadas, respectivamente. Os sinais fluorescentes para calceína-AM e etídio homodímero-1 são coletados a 488 nm (VAN DEN HURK et al., 1998). A calceína-AM é um diéster fluorogênico que atravessa passivamente a membrana celular, quando então é convertido por esterases intracelulares (ativas somente em células íntegras), a seu análogo negativo, impermeável e de fluorescência verde. No tocante ao EthD-1, com a perda da integridade ou aumento da permeabilidade da membrana, a atividade esterásica cessa e este corante reage com os ácidos nucleicos, produzindo fluorescência vermelha (VAN DEN HURK et al., 1998).

2.17.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET é uma técnica qualitativa e acurada, capaz de fornecer informações estruturais e químicas, produzindo imagens de elevada resolução. O sistema é baseado em um feixe de elétrons que atravessa uma amostra ultrafina e gera partículas e radiação que podem ser usadas para formar uma imagem ampliada (superiores a 10^6 vezes) ou realizar análise química da amostra (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Por meio destes recursos, a MET é capaz de detectar danos às membranas celulares e organelas que não são visíveis à microscopia de luz. É considerada uma ferramenta importante para avaliar a qualidade do folículo e do oócito (LUCCI et al., 2001).

Pelo fato de permitir a definição de imagens intracelulares, e estudos da morfologia celular, como aspectos gerais das organelas, o emprego da MET vem sendo bastante difundido (GALLETI, 2003), especialmente no que se refere ao desenvolvimento oocitário e qualidade embrionária, bem como atresia, e as alterações ultra-estruturais acarretadas por estes processos.

A estrutura e morfologia das organelas durante a maturação e desenvolvimento *in vitro* de embriões são de suma importância para entender as mudanças que ocorrem nessas etapas. As mitocôndrias são vitais para a sobrevivência celular e desenvolvimento embrionário (CHAPPEL, 2013). Produzem ATP no oócito que fornece energia para a fertilização e pré-implantação (TORNER et al., 2003) bem como a manutenção de reservas de cálcio intracelular (KRISHER, 2004). A cadeia do citoesqueleto contribui na redistribuição das mitocôndrias funcionais durante a maturação, desta forma, a redistribuição desorganizada

pode bloquear o desenvolvimento do embrião já que a demanda de energia do núcleo é alta durante este período (WANG et al., 2009).

3 CONCLUSÃO

Relação evidente foi demonstrada entre CFA, volume ovariano e morfometria da genitália externa em fêmeas das raças Brahman e Simental. O volume ovariano e a largura vulvar foram associadas à classificação de CFA, de modo que, maior volume ovariano e largura vulvar indicou maior CFA e maior produção *in vitro* de embriões. Assim, a proposta de utilização desses fenótipos deve ser considerada em modelos destinados à seleção de fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* para produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 193-202, jun. 2003.
- ABE, H. et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and - fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, n. 3, p. 325-335, jul. 1999.
- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 1, p. 57-66, jan. 2002.
- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p.127-140, jul. 2004.
- ADHIKARI, D. et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire *pool* of primordial follicles. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 765-770, dec. 2009.
- ADHIKARI, D. et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 19, n. 3, p.397-410, feb. 2010.
- ADONA, P. R. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 49-56, oct. 2008.
- ADONA, P. R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butirolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3 p. 354-359, jun. 2006.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 4, p. 901-905, apr. 2002.
- ALLER, J. F. et al. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 1-8, may. 2010.
- ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, may. 2000.
- AMORIM, C. A. et al. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 269-277, aug. 2000.

- ANDREOTI, M. **Produção *in vitro* de embriões bovinos: uso da glutathiona durante o processo de lavagem e capacitação espermática.** 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém. 2007.
- ANGUITA, B. et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 3, p. 526-536, feb. 2007.
- ARAÚJO, V. R. et al. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4, p. 305-310, abr. 2010.
- ARAÚJO, V. R. et al. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 12, n. 78, aug. 2014.
- ARMSTRONG, D. G. et al. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGFII and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 165, n. 1, p. 101–113, apr. 2000.
- BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 3, p. 1023–1031, sep. 2003.
- BÁO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1903–1921, jul. 1998.
- BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 537- 55, sep./oct. 2006.
- BARUSELLI, P.S. et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 9, p.1583–1593, dec. 2011.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 205- 211, abr./jun. 2007.
- BASSO, A. C. et al. Biotecnologia da Reprodução na Espécie Ovina: Produção *in vitro* de Embriões Ovinos: Aspectos da Técnica de Aspiração Folicular e do Tratamento Hormonal de Doadoras. **O Embrião**, Jaboticabal, v. 10, n. 38, p. 8-11, jan. 2008.
- BAVISTER, B. D.; YANAGIMACHI, R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 16, n. 2, p. 228-237, mar. 1977.
- BECKERS, J. F. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 31, p. 543-548, 1996.

BETTERIDGE, K. J. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 38, p. 87-98, may. 1989.

BETTS, D.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: Molecular and cellular concepts. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 445-453, aug. 2008.

BODENSTEINER, K. J. et al. Molecular cloning of de ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, n. 2, p. 381-6, feb. 1999.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VIANA, J. H. M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 1-4, 2005.

BOLS, P. E. J. et al. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 6, p. 1221-1236, apr. 1997.

BOLS, P. E. J. et al. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 5, p. 1001-1014, apr. 1996.

BONI, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 3, p. 362-369, jul./set. 2012.

BLONDIN, P. et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 1, p. 30-38, jan. 2009.

BORGES, A. M. et al. Ovarian follicular dynamics in crossbred Holstein-Zebu heifers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n 5, p. 595-604, out. 2004.

BRACKETT, B.G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 27, n. 1, p. 147-158, aug. 1982.

BRACKETT, B. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 39, n. 1, p. 43-64, jan. 1993.

BRÄNNSTRÖM, M. et al. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 7, n. 1, p. 67-73, 1995.

BREVINI, T. A. L. et al. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 1-2, p. 23-38, mar. 2007.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, New York, v. 66, n. 1, p. 5-13, jul. 2006.

BRUNO, J. B. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 21, n. 5, p. 679-687, may. 2009.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, n.11, p. 1-7, jul. 2008.

BUEHR, M. et al. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, New York, v. 198, n. 3, p.182-189, nov. 1993.

BURATINI, J. Jr. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 3, p. 421-431, aug. 2000.

BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for High variation among animals, very high repeatability in individuals and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005.

CAMARGO, L. S. A. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 19-28, jan./mar. 2006.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, jun. 2007.

CARLSSON, I. B. et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 2223-2227, sep. 2006.

CARVALHO, J .B. P. 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**, New York, n. 69, n. 2, p. 167-175, jan. 2008.

CARVALHO NETO, J. O. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões**. 2009. 91 p. Dissertação (mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina e Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 189-196, apr. 2007.

CECCONI, S. et al. Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor (s) released by gonadotropin-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen-activated protein kinase activation. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 149, n. 1, p. 100-107, jan. 2008.

- CHACUR, M. G. M. et al. Morphometry of ovaries of female zebu *Bos taurus indicus* collected in slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 65-70, fev. 2006.
- CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **Obstetrics and Gynecology International**, New York, v. 2013, p. 1-10, may. 2013.
- CHAVES, R. N. et al. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 37-49, jan/mar. 2010.
- CHENG, K. C. Regulation of MBK-2/DYRK by CDK-1 and the pseudophosphatases EGG-4 and EGG-5 during the oocyte-to-embryo transition. **Cell**, Cambridge, v. 139, n. 3, p. 560–572, oct. 2009.
- COLLADO, M. D. et al. Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 7, p. 689-694, jul. 2014.
- CONTI, M. Specificity of the cyclic adenosine 3', 5''-monophosphate signal in granulosa cell function. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 1653-61, dec. 2002.
- CRUZ, F. B. et al. Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 184-187, set. 2009.
- CUSHMAN, R. A. et al. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal Animal Science**, Champaign, v.87, n. 6, p.1971–1980, jun. 2009.
- CUSHMAN, R. A. et al. Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, n. 2, p. 349–354, feb. 1999.
- DAI, X. et al. Chk2 regulates cell cycle progression during mouse oocyte maturation and early embryo development. **Molecules and Cells**, Seoul, v.37, n. 2, p.126-132, feb. 2014.
- D'OCCHIO, M. J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion post-partum between zebu and European breed cattle. **Animal reproduction Science**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 311-317, jul. 1990.
- de LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of reproduction**, Colchester, v. 2, n. 1, p.48-54, jan. 1997.
- den TONKELAAR, I.; te VELDE, E. R.; LOOMAN, C. W. Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. **Maturitas**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 115–123, jun. 1998.

De ROOVER, R. et al. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 13-25, mar. 2005.

De SOUSA, P.A. et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 1, p. 115-128, jan. 1998.

DEWITT, D.; SMITH, W. L. Yes, but do they still get headaches. **Cellular**, Cambridge, v. 83, n. 3, p. 345-8, nov. 1995.

DRAGOVIC, R. A. et al. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 848-857, may. 2007.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, apr. 2001.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, Washington, v. 82, n. 1, p. 47-95, jan. 2002.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 2, p. 303-16, feb. 2015.

DURLINGER, A. L. L. et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, Los Angeles, v.143, n. 3, p.1076-1084, mar. 2002a.

DURLINGER, A. L. L.; VISSER, J. A.; THEMEN, A. P. N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 5, p. 601-609, nov. 2002b.

EPPIG, J.; O'BRIEN, M.; WIGGLEWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 44, n. 2, p.260-273, jun. 1996.

EPPIG, J. J. et al. Regulation of mammalian oocyte maturation. **The ovary**, Cap. 7, PART II: Oocyte Maturation and Ovulation, p. 113-129, jun. 2004.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, New York, v. 4, n. 3, p. 233-254, 1986.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 22, n. 1, p. 73-106, feb. 1980.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 103, n. 2, p. 463-470, nov. 1994.

- FAIR, T. et al. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and development**, New York, v. 43, n. 4, p. 503-12, apr. 1996.
- FAIR, T. et al. Global gene expression. analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, New York, v. 68, n. 1, p. 91-97, sep. 2007.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction Development**, New York, v. 42, n. 4, p. 437-442, dec. 1995.
- FARGHALY, T. A. et al. **Improving the success of *in vitro* maturation (IVM) by controlling the rate of oocyte maturation with meiotic inhibitors using bovine oocyte model.** v. 96, n. 3, Supplement, p.S105, oct. 2011.
- FERREIRA, M. A. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides.** 2010. 95 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.
- FERREIRA, R. et al. The Role of Angiotensin II in Bovine Follicular Growth. **41th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction.** 714 ed. 41th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction: Society for the Study of Reproduction, Kailua-Kona, p. 240–241, may. 2008.
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 5, p. 845-858, apr. 1995.
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 303-327.
- FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, jun. 1997.
- FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 99, n. 2, p. 673-9, nov. 1993.
- FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. **Developmental Biology**, New York, v. 128, n. 2, p. 453- 463, aug. 1988.
- FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 648-654, sep. 2001.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 50, n. 2, p. 225-232, feb. 1994.

FORTUNE, J. E. et al. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 60-71, jan. 2009.

FRAGA, C. G. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 24, p. 11003-11006, dec. 1991.

GALLETI, S. R. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**. São Paulo, v. 65, n. 1-2, p. 33-35, jan/dez. 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Journal Reproduction Science**, Netherlands, v. 42, n. 1-4, p. 371-379, apr. 1996.

GANDHI, A. P. et al. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, n. 2, p. 395-401, feb. 2000.

GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI E. F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p. 1255-76, apr. 2001.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais do I Simpósio internacional de reprodução animal aplicada**, Londrina, 2004. p. 223-230.

GAROR, R. et al. Prolonging oocyte *in vitro* culture and handling time does not compensate for a shorter interval from human chorionic gonadotropin administration to oocyte pickup. **Fertility and Sterility**, New York, v.103, n.1, p.72-75, jan. 2015.

GÉRARD, N. et al. The interleukin-1 system and female reproduction. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 180, n. 2, p. 203-212, feb. 2004.

GIBBONS, J. R. et al. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 3, p. 405-419, jul. 1994.

GILBERT, I. et al. Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 143, n. 6, p. 735-47, jun. 2012.

GILCHRIST, R. B. et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, n. 18, p. 3811-3821, sep. 2006.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 1, p. 6-15, jan. 2007.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, oct. 2003.

GINTHER, O. J. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 1, p. 75-87, jul. 1997.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 87, n. 1, p. 223-230, sep. 1989.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, dec. 1996.

GOMES, L. H. et al. Otimização do sistema de maturação *in vitro* de oócitos caprinos utilizando retinoides. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 6., 2012, Fortaleza. **Anais do XI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, Fortaleza, 2012, p. 431-434.

GÓMEZ, E. et al. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 8, p. 1013-1021, may. 2008.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 212-217, abr/jun. 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 261-291.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-196.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI International, 1994, 640 p.

GOTO, K. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free radical biology & medicine**, Tarrytown, v. 15, n. 1, p. 69-75, jul. 1993.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 82-94, abr/jun. 2009.

GREEN, D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 193, p. 5-9, jun. 2003.

GUEMRA, S. et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, may. 2013.

GUERREIRO, B. M. et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* Donos. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.49, p. 96–104, oct. 2014.

GUIMARÃES, A. L. S. et al. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 1, p. 52-57, jan. 2015.

GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, may. 2000.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormones, Growth factors, and Reproduction. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproduction in Farm Animals**. 7nd ed. Carolina do Sul: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E, p. 33-54, 2000.

HAMATANI, T. et al. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? **Reproduction**, Cambridge, v. 135, n. 5, p. 581- 592, may. 2008.

HANSEN, P. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. In: LAMB, G.C.; DILORENZO, N. (Ed.). **Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production**. 1nd ed. New York: Springer, 2014. p. 1-22.

HAYAKAYWA, H. et al. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 1, p. 68-73, jan. 2009.

HAYASHI, K; de SOUSA LOPES, S. M.; SURANI, M. A. Germ cell specification in mice. **Science**, New York, v. 316, n. 5823, p. 394–396, apr. 2007.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 61, n. 5, p. 909-902, apr. 2004.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 300, n. 2, p. 367-75, feb. 2002.

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

HONDA, A. et al. Isolation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 30, p. 12389–12394, jul. 2007.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 2, p. 675-685, jan. 2003.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, Washington, v. 80, n. 2, p. 593-614, apr. 2000.

HUANG, F. J. et al. Determination of the efficiency of controlled ovarian hyperstimulation in the gonadotropin-releasing hormone agonist-suppression cycle using the initial follicle count during gonadotropin stimulation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-96, feb. 2001.

HULSHOF, S. C. J. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 1, p. 133-42, jul. 1997.

HUMMITZSCH, K. et al. A New Model of Development of the Mammalian Ovary and Follicles. **Plos ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-16, feb. 2013.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 162-178, mar/apr. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Rebanho bovino brasileiro**. 2015. Disponível em: <http://loja.ibge.gov.br/perfil-dos-municipios-brasileiros-2015.html>. Acesso em: 15 out. 2017.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n.4, p. 14-26, 2014.

IRELAND, J. J. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1648-1658, jul. 2000.

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. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 23, n. 1, p. 1-14, jan. 2011.

IRELAND, J. J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, jun. 2007.

IRELAND, J. J. et al. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 954-964, may. 2009.

IRELAND, J. L. H. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, dec. 2008.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p. 1099-1105, 2002.

- JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1272–1281, jun. 2009.
- JOHN, G. B. et al. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. **Reproduction**, Cambridge, v. 133, n. 5, p. 855–863, may. 2007.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Ciclo celular e meiose. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 175-198.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia e seus Métodos de Estudo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (Ed.). **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 2-22.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZA, L. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, New York, v. 75, n. 4, p. 662–670, mar. 2011.
- KATZ-JAFFE, M. G. et al. Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 6, p. 939-946, apr. 2009.
- KIDDER, G. M.; VANDERHYDEN, B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 88, n. 4, p. 399-413, apr. 2010.
- KIM, B. K. et al. Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 83-92, feb. 2008.
- KIM, N. H et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. **Zygote**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 25-32, feb. 2000.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 191-206, aug. 2006.
- KOLLE, S. et al. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 836–42, oct. 1998.
- KOMAR, C. M. et al. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17 α -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 6, p. 1797-805, jun. 2001.
- KONIG, H. E.; LEIBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. v. 2. Porto Alegre: Artmed editora, 2004. 399p.

KORHONEN, K. et al. Effects of serum-free *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 45, n. 1, p. 42-49, feb. 2010.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 73, n. 3-4, p. 129-140, oct. 2002.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 14-23, jan. 2004.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 2, p. 292-302, feb. 2000.

KWEE, J. et al. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with *in vitro* fertilization. **Reproductive biology and endocrinology**, London, v.15, p. 5-9, 2007.

LEE, M. M. et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v. 81, n. 2, p. 571-576, feb. 1996.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 2, p. 401, aug. 2000.

LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **The journal of Cell Biology**, New York, v. 157, n. 4, p. 603-613, may. 2002.

LIMA-VERDE, I. B. et al. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles E2 and FSH in the culture of goat preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 191, p. 240-247, 2010.

LIU, K. et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, New York, v. 299, n. 1, p. 1-11, nov. 2006.

LIU, L. et al. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. **Development**, Cambridge, v. 134, n. 1, p. 199-209, jan. 2007.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 6, p. 1527-32, jun. 1998.

LONEGRO, N. et al. Antral follicle count as a predictor of ovarian response. **Revista Argentina de Radiologia**, Nuenos Aires, v. 80, n. 4, p. 252-257, jun. 2016.

LONERGAN, P. et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 64, n. 3, p. 369-378, mar. 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos- Dealing with the warts. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 1, p. 17-22, jan. 2008.

LONERGAN P.; FAIR T. Maturation of Oocytes *in vitro*. **Annual Review Animal Bioscience**, Palo Alto, v. 4. p. 255-68, nov. 2015.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 39-49, may. 1999.

LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 61-69, jul. 2001.

MacNEIL, M. D. et al. Genetic partitioning of variation in ovulatory follicle size and probability of pregnancy in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1646-1650, jul. 2006.

MACULAN, R. **Características indicadoras de fertilidade em fêmeas da raça Tabapuã**. 2015. 60 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

MAGALHÃES, D. M. et al. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, New York, v. 75, n. 1, p. 182-188, jan. 2011.

MAGALHÃES-PADILHA, D. M. et al. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Theriogenology**, New York, v. 77, n. 1, p. 206-213, jan. 2012.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 37, n. 7, p. 1344-9, jul. 2005.

MAJUMDER, K. et al. The use of anti-Mullerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 150, n. 2, p. 166-170, jun. 2010.

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 151, p. 1- 14, mar. 2011.

MARCELLO, M. R.; SINGARAVELU, G.; SINGSON, A. Fertilization. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 757, p. 321-350, 2013.

MARTINS, F. S. et al. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral

follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 43, n. 8, p. 728-736, aug. 2010.

MARTINS, F. S. et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 20, p. 916–924, oct. 2008.

MARTINS JR.; A. et al. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 1194-1194, 2007.

MATOS, M. H. T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 433-442, out./dez. 2007.

McDOUGALL, S. et al. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Research in Veterinary Science**, London, v. 58, n. 3, p. 212-6, may. 1995.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, New York, v. 21, n. 2, p. 200-214, apr. 2000.

McLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, Bristol, v. 137, n. 1, p. 1-11, jan. 2009.

MEIRELLES, F. V. et al. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia, Londrina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3., 2008, Londrina. **Anais do III Simpósio internacional de reprodução animal aplicada**, Londrina, 2008. p. 195-205.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 5, p. 1198–1207, nov. 1999.

MERCÉ, L. T. et al. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. **Human reproduction**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 1218-26, may. 2006.

MESQUITA, N. F. et al. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 62, n. 6, p. 587-590, dec. 2016.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 217–237, oct. 2003.

MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: LIMA, V. F. M. H. **Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução**, Jaboticabal: Funep, 2005.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA e SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different

concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, n. 3-4, p. 175-186, feb. 2002.

MODINA, S. C. et al. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 26, n. 2, p.235-244, jan. 2013.

MORGIA, F. M. et al. Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, New York, v. 85, n. 5, p. 1415-1419, may. 2006.

MOROTTI, F. et al. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 12, n. 3, p. 479–486, jul./sept. 2015.

MOSSA, F. et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 5, p. 2355-2361, may. 2012.

MOTLIK, J. et al. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 2, p. 461-469, jan. 1998.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 523-533, nov. 1990.

NAGASE, H. et al. Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 10, n. 1, p. 142-143, jan. 2003.

NEL-THEMAAT, L.; NAGY, Z. P. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. **Placenta**, Amsterdam, v. 3, p. 1-7, sep. 2011.

NIBART, M. et al. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A.E.T.E., 11., 1995, Hannover. **Anais da XI Réunion A.E.T.E.**, Hannover, 1995. p. 216.

NUTTINCK, F. et al. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 6, p. 1235-1245, apr. 1996.

OLIVEIRA, J. F. et al. Follicular development and steroid concentrations in cows with diferente levels of fertility raised under nutritional stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 1-10, sep. 2002.

OKTAY, K. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 67, n. 3, p. 481-486, mar. 1997.

- OSÉS, M. V. Utilización de sêmen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionária y fertilización *in vitro*. **Revista veterinária**, Corrientes, v. 20, n. 2, p. 138–145, ago. 2009.
- OTALA, M. et al. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Human Reproduction**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 228-236, mar. 2002.
- PALMA, G. A.; CLEMENT-SENCEWALD, A.; KREFFT, H. *In vitro* production of cattle embryos from calf oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 39, p. 278, 1993.
- PASSOS, J. R. S. et al. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival *in vitro*. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 54, p. 48–59, jan. 2016.
- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 31, n. 1, p. 63-67, jan. 1992.
- PENG, X. R. et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 129, n. 6, p. 3200-7, dec. 1991.
- PENITENTE-FILHO, J. M.; JIMENEZ, C. R.; OLIVEIRA, F. A. Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. **Revista CFMV**, Brasília, n. 61, p. 73-82, jan./abr. 2014.
- PERKEL, K. J. et al. The ART of Selecting the Best Embryo: A Review of Early Embryonic Mortality and Bovine Embryo Viability Assessment Methods. **Molecular Reproduction & Development**, Hoboken, v. 82, n. 11, p. 822–838, nov. 2015.
- PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 3, p. 684-689, mar. 2007.
- PETER, A. T. et al. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 9, p. 1343-1357, jun. 2009.
- PETYIM, S. et al. Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect cows animal well-being? **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 42, n. 6, p. 623-632, dec. 2007.
- PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p. 1193-1210, apr. 2001.
- PICTON; H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, oct. 1998.
- PIETERSE, M. C. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, New York, v. 30, n. 4, p. 751-762, oct. 1988.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 62, n. 5, p. 665-675, oct. 1935.

PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior and the estrus to ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 3, p. 667-81, feb. 1998.

PONTES, J. H. F. 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**, New York, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, jun. 2011.

PONTES, J. H. F. 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**, New York, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, nov. 2010.

PONTES, J. H. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 4, p. 690-697, mar. 2009.

PFEIFFER, K. E.; JURY, L. J.; LARSON, J. E. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 46, p. 58-64, jan. 2014.

RADOSTITS, O. M. **HERD HEALTH Food Animal Production Medicine**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. 884 p.

RANKIN, T. L. et al. Defective zona pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 7, p. 1119-1126, apr. 2001.

REDDY, P. et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 18, n. 15, p. 2813-2824, aug. 2009.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle *pool*. **Science**, Washington, v. 319, n. 5863, p. 611-613, feb. 2008.

REDDY, P. et al. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, New York, v. 281, n. 2, p. 160-170, may. 2005.

RHEINGANTZ, M.G.T. **Quem somos**. Disponível em:< http://minerva.ufpel.edu.br/~mgrheing/quem_somos.htm>. Acesso em: 05 de Agosto de 2017.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 4, p. 265-277, may. 1995b.

RHODES, F. M. et al. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 41-49, 1995a.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 1, p. 51-89, jan. 1980.

RICHARDS, J. S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, Chevy Chase, v. 15, n. 2, p. 209-18, feb. 2001.

RODRIGUES, A. S. et al. Antral follicle count in Nelore females subjected to fixed-time artificial insemination. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 4, p. 711-717, abr. 2015.

ROSE, R. C.; BODE, A. M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, n. 12, p. 1135-1142, sep. 1993.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, Basel, v. 24, p. 77-92, jan. 1983.

RUSSELL, D. F. et al. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 73, n. 10, p. 1255-1270, oct. 2006.

SADEU, J. C et al. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, apr. 2006.

SANTOS, G. M. G. et al. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, p. 451, 2013.

SANTOS, G. M. G. D. et al. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 165, p. 17-21, feb. 2016.

SARAIVA, M. V. A. et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 205-214, aug. 2011.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, apr. 2011.

SARTORI R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 5, p. 1403-9, nov. 2001.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 905-920, apr. 2004.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil De Medecine Veterinaire**, v. 157, p. 29-38, 1981.

SÁVIO, J. D. et al. Terminal follicular development and fertility in cattle is regulated by concentration of plasma progesterone. **Proceedings of 12th International Congress on Reproduction**, Netherlands, v. 2, p. 999-1002, 1992.

SCHEETZ, D. et al. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2012.

SCHEFFER, G. J. et al. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, n. 5, p. 845-851, nov. 1999.

SCHEFFER, G. J. et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 700-706, apr. 2003.

SEGERSON, E. C. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 1026-46, oct. 1984.

SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 178-182, jul./sept. 2005.

SENEDA, M. M. et al. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, jan./jun. 2002.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2nd ed. Washington: Current Conceptions Inc., p. 368, 2003.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 59-72, jan. 2000.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular cell**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 459-470, mar. 2002.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 48-51, feb. 2014a.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 228-232, apr. 2014b.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, oct. 2011.

SILVA, A. W. B. et al. Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. **Livestock Science**, Århus, v. 160, n. 4, p. 199–207, feb. 2014.

SILVA, J. R. V. et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, Netherlands, v. 43, n. 3, p. 203-209, mar. 2002.

SILVA, J. R. V. **Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles**. 2005. 142 p. Tese (Doutorado em Reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Holanda, 2005.

SILVA, J. R. V. et al. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 189, n. 1, p. 113-125, apr. 2006.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK R.; FIGUEIREDO J. R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 55, p. 23-135, apr. 2016.

SILVA, J. R. V. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, New York, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, jun. 2004.

SINGH, J. P.; BABCOCK, D. F.; LARDY, H. A. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. **The Biochemical Journal**, London, v. 172, n. 3, p. 549-56, jun. 1978.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p.1241-1254, apr. 2001.

SIRARD, M. A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, New York, v. 68, n. 1, p. 71-76, sep. 2007.

SIRARD, M. A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes, **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 40, n. 6, p. 1257-1263, jun. 1989.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 2, p. 483-497, jan. 1998.

SIROIS, J. et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 373-85, sep./oct. 2004.

SISSON, S.; GROSSMAN, J. D.; GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1, p. 887-893.

SMETANINA, I. G.; TATARINOVA, L. V.; KRIVOKHARDCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Ontogenez**, Moskva, v. 31, n. 2, p. 139-143, mar./apr. 2000.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 7, p. 1857-1872, jul. 1994.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 904-909, mar. 2001.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 217-245, jul. 2000.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society, 4 ed. **International Embryo Transfer Society**, Champaign, 2010.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 27, n. 1, p. 32-42, jan. 2009.

SU, L. et al. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 184-189, apr. 2012.

SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: A contemporary view. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 5-12, jan. 2002.

TAKAHASHI, M. et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 1, p. 137-145, jul. 2000.

TAYLOR, C., RAJAMAHENDRAM, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function pregnant versus nonpregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 115-23, jan. 1991.

TEIXEIRA, J.; MAHESWARAN, S.; DONAHOE, P. K. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 22, n. 5, p. 657-674, oct. 2001.

TESFAYE, D. et al. Suppression of the transcription factor MSX1 gene delays bovine preimplantation embryo development *in vitro*. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 5, p. 857-870, may. 2010.

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: a report from the IETS data retrieval committee. In: International Embryo Transfer Society Newsletter, 30.,

2004, Portland. **Anais do XXX do International Embryo Transfer Society Newsletter**, Portland, 2004. p. 12-19.

THOMAS, F. H.; WALTERS, A. K.; TELFER, E. E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 541-555, nov./dec. 2003.

THOMPSON, J. G. et al. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 53, n. 6, p. 1385-1391, dec. 1995.

TIBBETTS, M. D.; ZHENG, L.; LENARDO, M. J. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. **Nature Immunology**, New York, v. 4, n. 5, p. 404-409, may. 2003.

TORNER, H. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. **Theriogenology**, New York, v. 61, n. 9, p. 1675-1689, jun. 2003.

ULLOA, S. M. B. et al. Effects of different oocyte retrieval and *in vitro* maturation systems on bovine embryo development and quality. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 367-377, jun. 2014.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T., *et al.* Effect of pH of culture medium on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 1, p. 286, jan. 1997.

VAN DEN HURK, R. et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 833-841, nov./dec. 1998.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, apr. 2005.

VAN SOOM, A. et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 5, p. 1453-1465, mar. 2002.

VAN WEZEL, I. L. et al. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular and Endocrinology**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 133-40, dec. 1995.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 100-109, abr./jun. 2008.

VASCONCELOS, G. L. et al. Effects of growth differentiation factor-9 and FSH on *in vitro* development, viability and mRNA expression in bovine preantral follicles. **Reproduction Fertility Development**, East Melbourne, v. 25, n. 8, p. 1194-1203, mar. 2013.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 2696-2702, oct. 1994.

VIANA, J. H. M. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, dez. 2000.

VIANA, J. H. M. et al. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 1, p. 12-18, jan./mar. 2012.

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**, New York, v. 82, n. 2, p. 204–212, jul. 2014b.

VIEIRA, L. M. et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 82, n. 2, p. 318–324, jul. 2014a.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 47, n. 5, p. 814–22, nov. 1992.

WANG, L. et al. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v. 10, n. 7, p. 483-492, jul. 2009.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. e NEIL, J. D. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1994, p. 79-122.

WATANABE, M. R. et al. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 1, p. 438, 1999.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 66, n. 3-4, p. 175-184, may. 2001.

WILDING, M. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 909-917, may. 2001.

WOOLUMS, A. R.; PETER, A. T. Cystic ovarian condition in cattle: Part I. Folliculogenesis and ovulation. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, United States, v. 16, p. 935-943, 1994.

WU, Y. T. et al. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 1526–1531, jun. 2007.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, Ube, v. 10, p. 69-79, jun. 2011.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, n. 9, p. 1095–104, sep. 2007.

YING, Y.; QI, X.; ZHAO, G. Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 14, p. 7858–7862, jul. 2001.

YOSHINO, O. et al. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10678-10683, jul. 2006.

YOUNIS, A. I.; BRACKETT B. G. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 31, n. 2, p. 44-51, feb. 1992.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 01 - CONTAGEM FOLICULAR ANTRAL E VOLUME OVARIANO COMO PREDITORES DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

Artigo formatado segundo as normas da revista *Theriogenology*

Contagem folicular antral e volume ovariano como preditores do potencial de produção de oócitos bovinos

G. L. Vasconcelos^a, E. V. Cunha^b, R. Maculan^a, G. M. Moreira^a, A. W. B. Silva^b, M. A. M. Donato^c, C. A. Peixoto^c, J. R. V. Silva^b, J. C. Souza^{a,*}

^aAnimal Science Department, Federal University of Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

^bBiotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

^cLaboratory of Ultrastructure, CNPqAM/FIOCRUZ, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

*Corresponding address (J. C. Souza): Animal Science Department, Federal University of Lavras, Câmpus Universitário, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil, Caixa Postal 3037, Phone/Fax: +55 35 3829-1231 [jcamisao@yahoo.com.br]

Resumo

As relações entre a classe de contagem folicular antral (CFA), população e sobrevivência folicular pré-antral, progressão meiótica e ultraestrutura dos complexos cumulus oócito (CCOs) maturados *in vitro* e volume ovariano (VO) em fêmeas bovinas mestiças de *Bos taurus indicus* foram avaliadas. Foram estabelecidas classes de CFA alta (≥ 50 folículos),

intermediária (30 – 49 folículos) e baixa (<30 folículos) e de VO grande (> 11mm³), média (> 8 e ≤ 11 mm³) e pequena (≤ 8 mm³). Houve correlação positiva (P<0,05) entre CFA e os números de folículos primordiais normais (r=0,90), degenerados (r=0,69) e total (r=0,90), folículos secundários normais (r=0,57) e total (r=0,53). Os números médios de oócitos graus I, II, viáveis e VO na classe CFA alta (7,86±0,60; 4,02±0,39; 16,26±1,11 e 12,60±0,74mm³) foram superiores (P<0,05) do que nas classes intermediária (4,85±0,67; 2,76±0,43; 13,05±1,23 e 10,10±0,75mm³) e baixa (3,27±0,73; 1,24±0,47; 8,07±1,34 e 8,09±0,86mm³). O total de oócitos na classe CFA baixa foi menor (P<0,05) do que na classe intermediária (20,81±6,23 vs. 38,32±5,75). A média de CFA total na classe CVO grande (58,50±3,94) foi maior (P<0,05) do que nas classes média (45,39±4,0) e pequena (31,62±3,94). A quantidade de oócitos grau I e viáveis nas classes de VO grande (6,69±0,72 e 16,12±1,29) e média (6,22±0,74 e 15,03±1,31) foram superiores (P<0,05) à classe pequena (3,72±0,2 e 9,37±1,29). Os números de oócitos grau II e o total de oócitos na classe de VO grande (3,53±0,48 e 41,27±6,02) foram superiores (P<0,05) à classe pequena (2,19±0,48 e 21,54±6,02). A CFA refletiu-se na porcentagem de oócitos em metáfase II (MII), onde CFA alta foi superior a intermediária e baixa (P<0,0001) e a intermediária superior a baixa (P<0,0001). A proporção de oócitos nos estágios de metáfase I (MI), telófase I (TI) e anáfase I (AI) na CFA intermediária (26,04%) foi superior (P<0,05) às classes alta (8,55%) e baixa (14,15%). O percentual de oócitos no estágio de quebra da vesícula germinativa (QVG) na CFA baixa (32,08%) foi superior (P<0,0001) à alta (5,98%) e intermediária (8,33%). A proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) na CFA baixa (12,26%) foi superior (P<0,05) à classe alta (4,27%) e intermediária (3,13%). Pode-se concluir que a CFA e o volume ovariano são características associadas e que a CFA pode ser utilizada como preditora de oócitos recuperados e progressão meiótica de CCOs.

Palavras-chave: Ativação folicular, maturação *in vitro*, sobrevivência, ultraestrutura.

1. Introdução

A competência oocitária *in vitro* representa a capacidade do oócito completar a maturação *in vitro* (MIV), ser fertilizado e alcançar o estágio de blastocisto [1]. As taxas de blastocisto após a FIV e o cultivo *in vitro* de embriões (CIVE) são menores nos oócitos maturados *in vitro*, quando comparadas às de embriões produzidos *in vivo* [2]. Com isso, pode-se presumir que a MIV ainda constitui um desafio para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). O sucesso da MIV pode ser afetado por muitos fatores, dentre eles a morfologia do complexo cumulus oócito (CCOs), a competência do oócito e as condições de MIV [3]. A MIV é caracterizada pela progressão do desenvolvimento do estágio de vesícula germinativa à metáfase II (MII). Nesse estágio, o oócito necessita completar seu desenvolvimento para receber os espermatozoides sob condições artificiais. A partir disso, o oócito é preparado para ser fecundado e passar pelo desenvolvimento embrionário [4].

A capacidade de desenvolvimento oocitário pode ser influenciada pelas condições fisiológicas da doadora, tais como estágios do ciclo estral e do desenvolvimento folicular [4]. A contagem folicular antral (CFA) é uma característica de fácil avaliação e pode indicar maior fertilidade de fêmeas bovinas. No entanto, faz-se necessária a avaliação dos oócitos em sua fertilidade *in vitro* [5]. Outra medida reprodutiva que possui relação direta com a produção hormonal exigida em cada etapa do ciclo estral é o volume ovariano (VO) [6]. Tal medida também vem sendo utilizada como preditor da reserva folicular ovariana [7]. Entretanto, o efeito da CFA e VO na progressão meiótica e ultraestrutura de CCOs maturados *in vitro* não foram analisados.

Com o intuito de se obter maior precisão na avaliação da progressão meiótica e morfologia oocitária após a MIV, diferentes técnicas estão sendo utilizadas, as quais a

microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Hipotetiza-se que a associação de CFA com VO está relacionada com características reprodutivas do estudo e que CFA alta reflete promove progressão meiótica de CCOs em fêmeas bovinas.

Os objetivos foram avaliar o efeito da CFA na ativação dos folículos presentes na reserva folicular, a associação da CFA e VO com características reprodutivas, o efeito da CFA na progressão meiótica e ultraestrutura dos CCOs maturados *in vitro* em fêmeas bovinas foram avaliados.

2. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos e protocolos relacionados com animais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no uso de animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA) da Universidade Federal de Lavras- MG, Minas Gerais, Brasil com protocolo de nº (068/14). Todos os reagentes foram da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), a não ser que indicado de outra forma.

2.1 Experimento 1: efeito da classe de CFA na ativação dos folículos em ovários bovinos

2.1.1 Procedimentos

Ovários (n=30) foram obtidos em um abatedouro local localizado no sul de Minas Gerais-BR, oriundos de 15 vacas adultas (3 a 10 anos de idade, com média de 6 anos), sem raça definida (predominância *Bos taurus indicus*), cíclicas, múltíparas e com condição corporal entre 3 e 4 (1-magra a 5-obesa) [8]. Os ovários (direito e esquerdo) foram separados em classe de CFA alta (≥ 50 folículos; n=10); intermediária (30 – 49 folículos; n=10) e baixa (<30 folículos; n=10) [9].

Imediatamente *post-mortem*, os ovários foram lavados em álcool a 70% por 10 segundos e duas vezes com solução salina 0,9% (NaCl) à 37°C, suplementado com 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Company, St, Louis/USA). Os pares de ovários foram transportados dentro de uma hora para o laboratório em solução salina a 4°C contendo antibióticos [10].

2.1.2. Análise histológica

Para estudos histológicos, tecidos corticais ovarianos foram cortados em 40 fragmentos (3 mm x 3 mm x 1 mm) ovarianos usando tesoura e bisturi. Os fragmentos foram diretamente fixados em paraformaldeído a 4% em PBS com pH 7,4 durante à noite em temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em série graduada de etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina. Após inclusão em parafina (Synth, São Paulo, Brasil), foram seccionados em série a intervalos de 7 µm, colocados em lâminas de microscópio de vidro, corados com eosina e ácido periódico Schiff-hematoxilina e analisados quanto ao número de folículos (primordiais, primários, secundários) e morfologia (normais e degenerados). Fragmentos ovarianos foram examinados em um microscópio (Nikon, Tokyo, Japan) sob magnitude de 400X.

Estágio e sobrevivência folicular foram avaliados microscopicamente em secções seriadas. Os folículos foram classificados como primordiais quando consistiam de um oócito circundado por uma camada de célula da granulosa achatada ou com a presença de células achatadas e cuboides. Folículos em desenvolvimento foram classificados como primários quando continham uma camada de células da granulosa cuboidal e secundários quando eram visíveis duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidal ao redor do oócito. Os folículos foram individualmente classificados histologicamente como normal quando possuíam um oócito intacto rodeado por células da granulosa bem organizadas e sem a

presença de núcleo picnótico. Folículos degenerados foram definidos com um oócito retraído, núcleo picnótico e células da granulosa desorganizadas e destacadas da membrana basal [11]. Para avaliar a ativação folicular, o número médio total de folículos primordiais, primários e secundários (normais e degenerados) por animal foi estimado pela contagem por ovário em cada classificação folicular. O número total de folículos contados para cada secção foi altamente correlacionado ($r = 0,9895$) [12].

2.1.3 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram executadas pelo programa estatístico SAS® (SAS, Cary, NC, USA). Os dados gerais foram testados para a normalidade pelo teste Shapiro Wilk de acordo com o procedimento UNIVARIATE, e quando necessário, transformados para atingir a normalidade. Os valores médios dos grupos de CFA foram comparados utilizando o procedimento GLIMMIX. Todas as variáveis foram submetidas ao teste de correlação pelo procedimento CORR. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

2.2 Experimento 2: efeito da classe de CFA e VO sobre as características reprodutivas em ovários bovinos

2.2.1 Procedimentos

Ovários ($n=210$) oriundos de um abatedouro local localizado no sul de Minas Gerais-BR, de ($n=105$) vacas adultas (3 a 10 anos de idade, com média de 6 anos) sem raça definida (predominância *Bos taurus indicus*), com condição corporal 3 e 4 (1-magra a 5-obesa) [8] foram utilizados para o experimento. Os ovários foram transportados ao laboratório em

solução salina (NaCl) 0,9% a 37°C, contendo penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100 mg/ml; Sigma Chemical Company, St, Louis/USA) durante o prazo máximo de uma hora.

2.2.2 *Classificação folicular e aspiração oocitária*

Pares de ovários foram distribuídos em classes de CFA alta (≥ 50 folículos; $n=42$); intermediária (30 – 49 folículos; $n=34$) e baixa (<30 folículos; $n=29$) [9]. Nas três classes, os CCOs foram aspirados de folículos entre 3 e 8mm de diâmetro utilizando seringas de 10 mL e agulha 40G. Somente oócitos de qualidade I, II e III foram utilizados no experimento. CCOs foram contados e classificados de acordo com Stringfellow and Givens [13]: Grau I: oócitos com cumulus compacto com mais de três camadas de células. Ooplasma com grânulos finos e homogêneos, circundado pela zona pelúcida e com cor marrom; Grau II: oócitos com menos de três camadas de células do cumulus. Ooplasma com grânulos distribuídos heterogeneamente que podem estar mais concentrados no centro e mais leves na periferia, ou condensados em um lugar aparecendo como ponto escuro. Ooplasma preencheu todo espaço dentro da zona pelúcida; Grau III: oócitos com cumulus expandidos. Ooplasma pode estar contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico.

2.2.3 *Mensuração do volume ovariano total*

Pares de ovários ($n=95$) foram classificados quanto ao volume ovariano total (direito e esquerdo) em grande ($> 11\text{mm}^3$; $n = 32$), médio (> 8 e $\leq 11 \text{mm}^3$; $n = 31$) e pequeno ($\leq 8 \text{mm}^3$; $n = 32$). Comprimento, largura e altura do ovário, em mm, foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (150mm/0,01mm Powerfix Nf, Digimess, São Paulo, BR). O cálculo do volume ovariano foi realizado pela fórmula: 0,5 (fator de correção) x comprimento

x largura x altura [14]. A soma dos volumes dos ovários direito e esquerdo foi definida como volume ovariano total.

2.2.4 *Maturação in vitro (MIV) dos CCOs*

CCOs viáveis foram colocados em gotas de 90 µl de meio de maturação (máximo 30 oócitos/gota) que consiste em *Tissue Culture Medium* (TCM-199) suplementado com 22 µg/mL de piruvato de sódio, 5 µg/mL de FSH bovino, 10 UI/mL de LH, 20 µg/mL de estradiol, 20 mg/mL de amicacina e 10% de soro fetal bovino (SFB), e equilibrado em incubadora durante pelo menos 2 h. A MIV de CCOs foi realizada durante 24 h a 38,7°C com 5% de CO₂ numa atmosfera umidificada.

2.2.5 *Avaliação da progressão meiótica dos CCOs*

Oócitos (n=319) das classes (alta; n=177, intermediária; n= 96 e baixa; n=106) de CFA foram analisados por microscopia de fluorescência. Para a avaliação da configuração da cromatina e progressão meiótica, as células do cumulus foram removidas por vortex e os oócitos foram fixados em 4% de paraformaldeído por 15 min e transferidos para solução de Triton X-100 a 0,5%. Mudanças na configuração da cromatina foram avaliadas em gotas de 10µL contendo 10µg/mL de tricloridrato de bisbenzimidazol (Hoechst 33342) e analisados pelo microscópio invertido de fluorescência (Leica, DMI4000B). Os sinais de fluorescência emitidos de Hoechst 33342 foram coletados em 568 nm. Oócitos foram classificados de acordo com o estágio de maturação nuclear: vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (QVG), metáfase I, anáfase I e telófase I (MI/AI/TI) e metáfase II (MII).

2.2.7 Características ultraestruturais dos CCOs maturados *in vitro* bovinos

CCOs maturados *in vitro* (n = 30) provenientes de vacas com diferentes CFAs (n = 10 oócitos por classe de CFA) foram examinados pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). CCOs foram fixados em solução de Karnovsky (4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M; pH 7,2) durante 4 h à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Após a fixação, CCOs cultivados foram mantidos em tampão cacodilato de sódio. Os espécimes foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em tampão cacodilato de sódio e contra-corados com acetato de uranila a 5%. As amostras foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de acetona e depois incorporadas em resina epoxi (Epoxy-Embedding Kit, Fluka Chemika-BioChemika). Posteriormente, foram cortadas em secções semi-finas (2 µm), coradas com azul de toluidina e analisadas por microscopia óptica com ampliação de 400X. Secções ultrafinas (70nm) foram obtidas de CCOs bovinos classificados como morfológicamente normais nas secções semi-finas. Posteriormente, secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas sob um microscópio eletrônico Fei Tecnai Spirit. Pelo menos cinco CCOs de cada grupo foram utilizados para análise de MET. Os parâmetros ultraestruturais avaliados foram a densidade e integridade das organelas citoplasmáticas do oócito e das células da granulosa e o grau de vacuolização citoplasmática e nuclear.

2.2.8 Análise estatística

Todas as análises foram executadas pelo programa estatístico SAS® (SAS, Cary, NC, USA). Os dados foram testados para a normalidade pelo teste Shapiro Wilk de acordo com o procedimento UNIVARIATE, e transformados para atingir a normalidade quando

necessário. Os efeitos fixos de classes de CFA e VO foram submetidos ao procedimento GLIMMIX. Os dados são mostrados como a média \pm erro padrão da média (EPM). O efeito da classe de CFA sobre a porcentagem de distribuição dos oócitos nos estágios da meiose (vesícula germinativa: VG, quebra da vesícula germinativa: QVG, metáfase I, anáfase I e telófase I: MI/AI/TI e metáfase II: MII) foram submetidos ao procedimento GENMOD como distribuição binomial. As diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Experimento 1: efeito da classe de CFA na ativação dos folículos em ovários bovinos

Análise histológica demonstrou folículos pré-antrais normais (Fig. 1A, C e E) e degenerados (Fig. 1B, D e F) nas classes de alta, intermediária e baixa CFA.

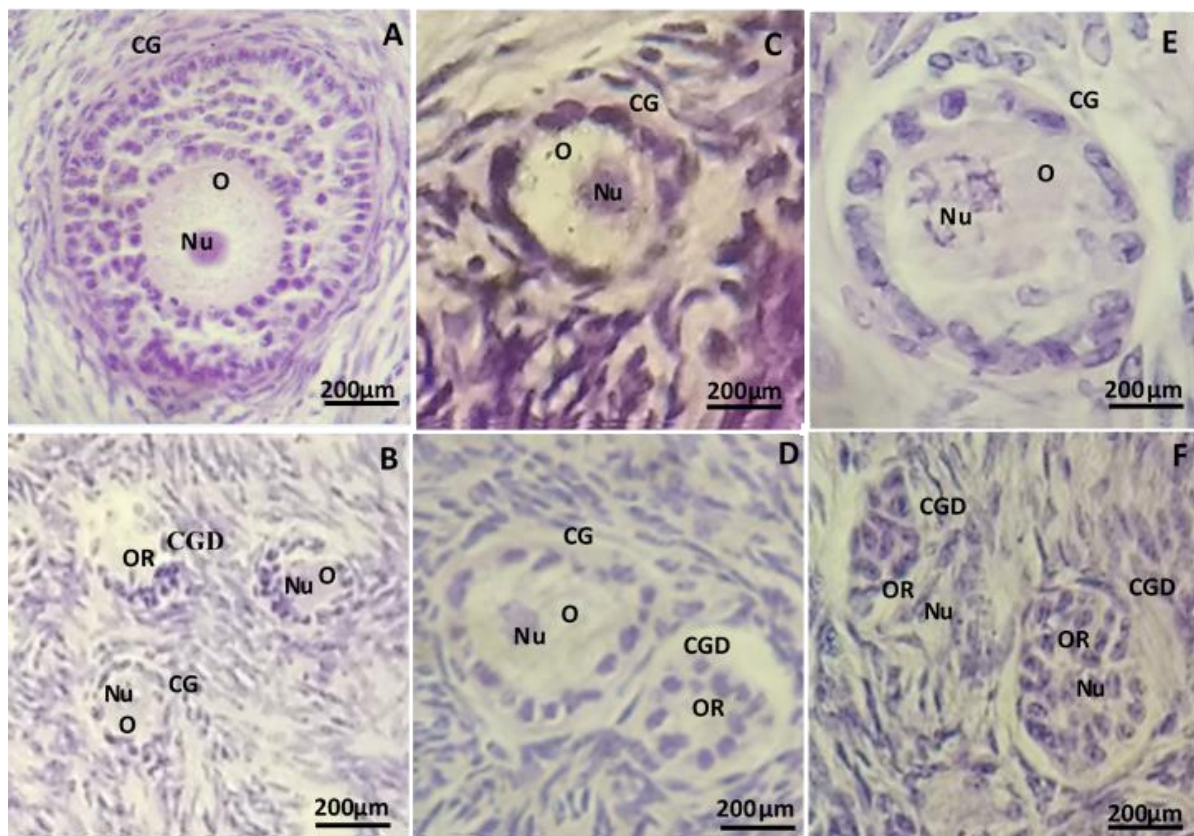


Fig. 1. Seções histológicas de folículos pré-antrais normais e degenerados nas classes de alta (A, B), intermediária (C, D) e baixa (E, F) contagem folicular antral (CFA). Folículo (s) (A)

secundário normal e (B) primordiais e primários degenerados na classe de alta CFA; (C) primordial normal e (D) primários degenerados na classe de intermediária CFA; (E) primário normal e (F) primários degenerados na classe de baixa CFA. **Nu**: núcleo do oócito; **O**: oócito; **CG**: células da granulosa; **OR**: oócito retraído; **CGD**: células da granulosa desorganizadas.

A média de folículos primordiais (Fig. 2A) e primários normais (Fig. 2B) na classe de CFA alta foi superior ($P < 0,001$) aos das classes intermediária e baixa. O número de folículos primordiais degenerados (Fig. 2A) e secundários normais (Fig. 2C) foi maior ($P < 0,05$) nos ovários das classes de CFA alta e intermediária, comparada com os da classe baixa. O número de folículos primários degenerados da classe de CFA alta foi superior ($P < 0,05$) ao da classe baixa CFA (Fig. 2B). A quantidade de folículos secundários degenerados da classe de CFA intermediária foi superior ($P = 0,01$) à de baixa (Fig. 2C).

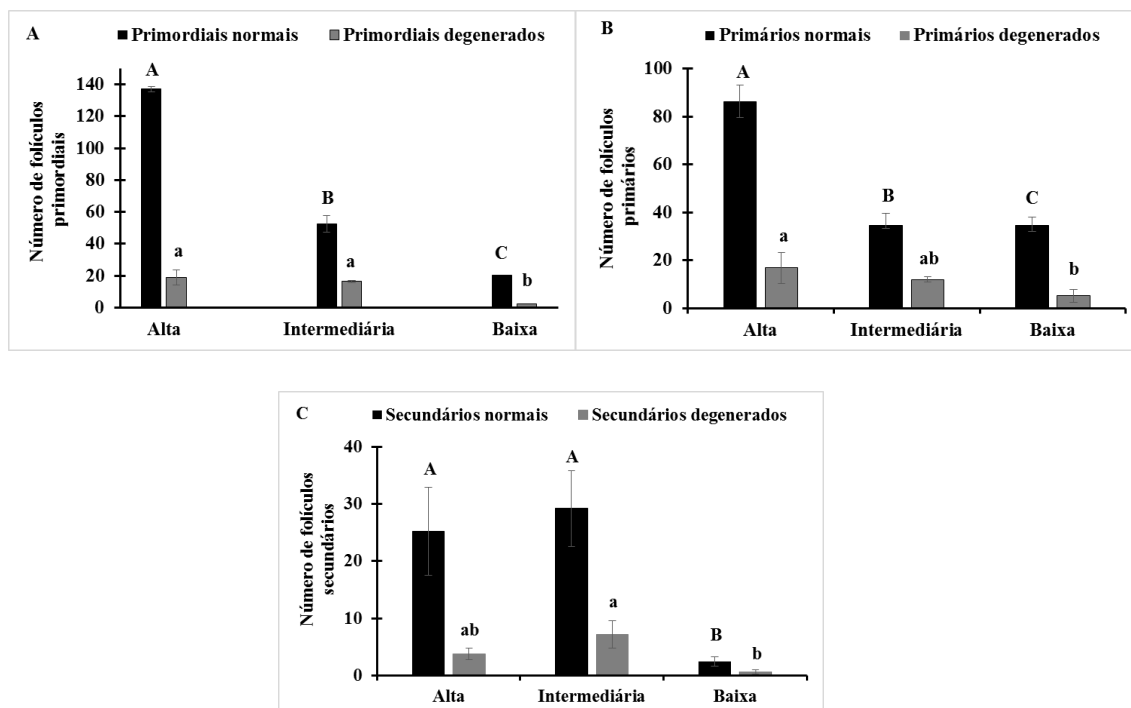


Fig. 2. Número médio de folículos primordiais, primários e secundários normais e degenerados nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA). Letras maiúsculas indicam diferenças entre folículos normais e as minúsculas entre folículos degenerados ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

As correlações entre CFA e o número de folículos primordiais normais, degenerados e total, secundários normais e total desses folículos são apresentadas na tab. 1. As correlações entre as diferentes classes de folículos são apresentadas na tab.1.

Tab. 1. Coeficiente de correlações entre contagem folicular antral (CFA) e as categorias foliculares normais, degenerados e total.

Variáveis	CFA	Nº de primordial normal	Nº de primordial degenerado	Nº de primordial total	Nº de primário normal	Nº de primário degenerado	Nº de primário total	Nº de secundário normal	Nº de secundário degenerado	Nº de secundário total
CFA	1	0,90**	0,69**	0,90**	0,51	0,33	0,50	0,57*	0,28	0,53*
Nº de primordial normal		1	0,72**	0,99**	0,73**	0,63*	0,75**	0,40	0,21	0,38
Nº de primordial degenerado			1	0,79**	0,44	0,69**	0,52*	0,55*	0,60*	0,58*
Nº de primordial total				1	0,71**	0,66**	0,74**	0,44	0,27	0,43
Nº de primário normal					1	0,67**	0,99**	0,46	0,27	0,45
Nº de primário degenerado						1	0,78**	0,16	0,30	0,20
Nº de primário total							1	0,43	0,30	0,42
Nº de secundário normal								1	0,76**	0,99**
Nº de secundário degenerado									1	0,83**
Nº de secundário total										1

*P<0,05 **P<0,01

3.2 Experimento 2: efeito da classe de CFA e VO sobre as características reprodutivas em ovários bovinos

O número médio de oócitos de graus II e viáveis na classe de alta CFA foram maiores ($P<0,05$) do que nas demais classes (Tab. 2). Nessas mesmas características, a classe CFA intermediária foi maior ($P<0,05$) do que a baixa. A quantidade de oócitos grau I e o VO na classe de alta CFA foram superiores ($P<0,05$) às demais classes. O total de oócitos na classe de baixa CFA foi menor ($P<0,05$) do que na classe intermediária (Tab. 2).

Tab. 2. Efeito da classe de contagem folicular antral (CFA) sobre características reprodutivas.

Características	Contagem folicular antral (CFA)		
	Alta (A) n=35	Intermediária (I) n=34	Baixa (B) n=26
Graus oocitários			
GI	7,86±0,60 ^a	4,85±0,67 ^b	3,27±0,73 ^b
GII	4,02±0,39 ^a	2,76±0,43 ^b	1,24±0,47 ^c
GIII	2,09±0,39 ^a	2,48±0,44 ^a	1,27±0,47 ^a
Oócitos viáveis			
Total de oócitos	16,26±1,11 ^a	13,05±1,23 ^b	8,07±1,34 ^c
Volume ovariano	30,97±5,17 ^{ab}	38,32±5,75 ^a	20,81±6,23 ^b

GI: Grau oocitário I; **GII:** Grau oocitário II; **GIII:** Grau oocitário III. Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P<0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

A CFA total na classe de VO grande foi maior ($P<0,05$) que nas demais classes. Nessa mesma característica, a classe de VO média foi maior ($P<0,05$) do que a pequena (Tab. 3). A

quantidade de oócitos graus I e viáveis nas classes grande e média foram superiores ($P<0,05$) do que na classe de VO pequena. O número médio de oócitos grau II e total de oócitos na classe de VO grande foi maior ($P<0,05$) do que na classe pequena. Não houve diferença em relação ao grau oocitário III entre as classes de VO ($P>0,05$; tab. 3).

Tabela 3. Efeito da classe de volume ovariano (VO) sobre as características reprodutivas.

Características	Classe de volume ovariano (VO)		
	Grande (G) n=32	Média (M) n=31	Pequena (P) n=32
CFA total	58,50±3,94 ^a	45,39±4,00 ^b	31,62±3,94 ^c
Graus oocitários			
GI	6,69±0,72 ^a	6,22±0,74 ^a	3,72±0,72 ^b
GII	3,53±0,48 ^a	3,29±0,49 ^{ab}	2,19±0,48 ^b
GIII	1,97±0,46 ^a	2,52±0,47 ^a	2,10±0,47 ^a
Oócitos viáveis	16,12±1,29 ^a	15,03±1,31 ^a	9,37±1,29 ^b
Total de oócitos	41,27±6,02 ^a	36,07±6,12 ^{ab}	21,54±6,02 ^b

GI: Grau oocitário I; **GII:** Grau oocitário II; **GIII:** Grau oocitário III. Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P<0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Após 24h de MIV, 62,38% (199/319) dos oócitos estavam em MII (Tab. 4). A proporção de oócitos em MII diferiu ($P<0,05$) entre as classes de CFA. A porcentagem de oócitos em MI, TI, AI foi superior ($P<0,05$) na classe intermediária em relação às classes de alta e baixa CFA. As porcentagens de oócitos em estágio de VG ($P<0,05$) e QVG ($P<0,0001$) na classe baixa foram superiores às observadas nas classes alta e intermediária (Fig. 3 A-E; tab. 4).

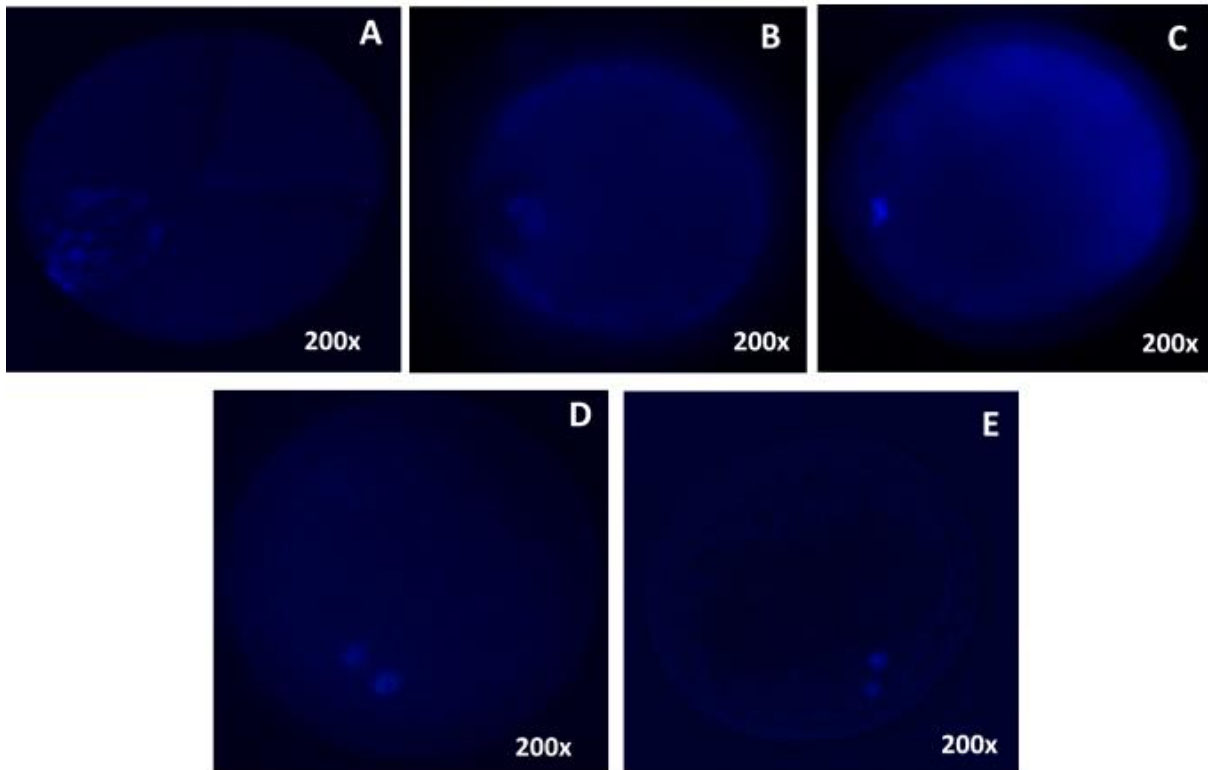


Fig. 3. Fotomicrografia de oócitos bovinos em diferentes estágios de maturação nuclear nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA) avaliados sob microscópio de fluorescência. Oócito em A) Vesícula germinativa (VG) e B) Quebra de vesícula germinativa (QVG) na classe de baixa CFA; C) Metáfase I (MI) e D) Telófase I (TI) na classe de intermediária CFA; E) Metáfase II (MII) na classe de alta CFA. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 568 nm. Aumento 200X.

Tab. 4. Porcentagem (%) de oócitos em estágios de vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa, fases intermediárias (Metáfase I, Anáfase I, Telófase I) e metáfase II nas classes de alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA).

CFA	N	VG (%)	QVG (%)	MI, AI, TI (%)	MII (%)
Alta	177	4,27 (5/117) ^b	5,98 (7/117) ^b	8,55 (10/117) ^b	81,20 (95/117) ^a
Intermediária	96	3,13 (3/96) ^b	8,33 (8/96) ^b	26,04 (25/96) ^a	62,50 (60/96) ^b
Baixa	106	12,26 (13/106) ^a	32,08 (34/106) ^a	14,15 (15/106) ^b	41,51 (44/106) ^c
Total	319	6,58 (21/319)	15,36 (49/319)	15,67 (50/319)	62,38 (199/319)

CFA: Contagem folicular antral; **VG:** vesícula germinativa; **QVG:** Quebra da Vesícula Germinativa; **MI:** Metáfase I; **AI:** Anáfase I; **TI:** telófase I; **MII:** Metáfase II. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$).

Nas análises ultraestruturais foram observadas diferentes organelas citoplasmáticas de oócitos e células da granulosa em todas as classes de CFA. Considerando-se que para uma comparação efetiva entre as diferentes classes de CFA não somente a presença das organelas, mas a localização das mesmas e a morfologia são necessárias. Os oócitos das diferentes contagens de CFA mostraram-se com ultraestrutura normal, mitocôndrias de cristas bem visíveis e em grande número, presença de vacúolos intracelulares, gotículas lipídicas distribuídas uniformemente e foi possível observar complexos de Golgi agrupados e bem desenvolvidos, como o esperado nesses tipos celulares. Não foi possível observar diferenças ultraestruturais entre as organelas das diferentes classes de CFA. A zona pelúcida (ZP) também foi mantida íntegra em todos os grupos. As células da granulosa mostraram-se bem características, com núcleo definido - geralmente arredondado ou com leves endentações - e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, assim como o complexo de Golgi característico desse tipo celular foi visto em

algumas organelas. As mitocôndrias possuem cristas bem definidas e foi possível observar em algumas células a presença de vacúolos lipídicos. Todas as características observadas nas células da granulosa foram similares entre os grupos, não sendo possível diferenciar os mesmos com base nas características morfológicas. Após a análise de diferentes CCOs não foi possível observar alterações que sugerissem diferenças ultraestruturais entre as diferentes classes de CFA, sugerindo que as diferenças entre os grupos podem não ser morfológica (Fig. 4).

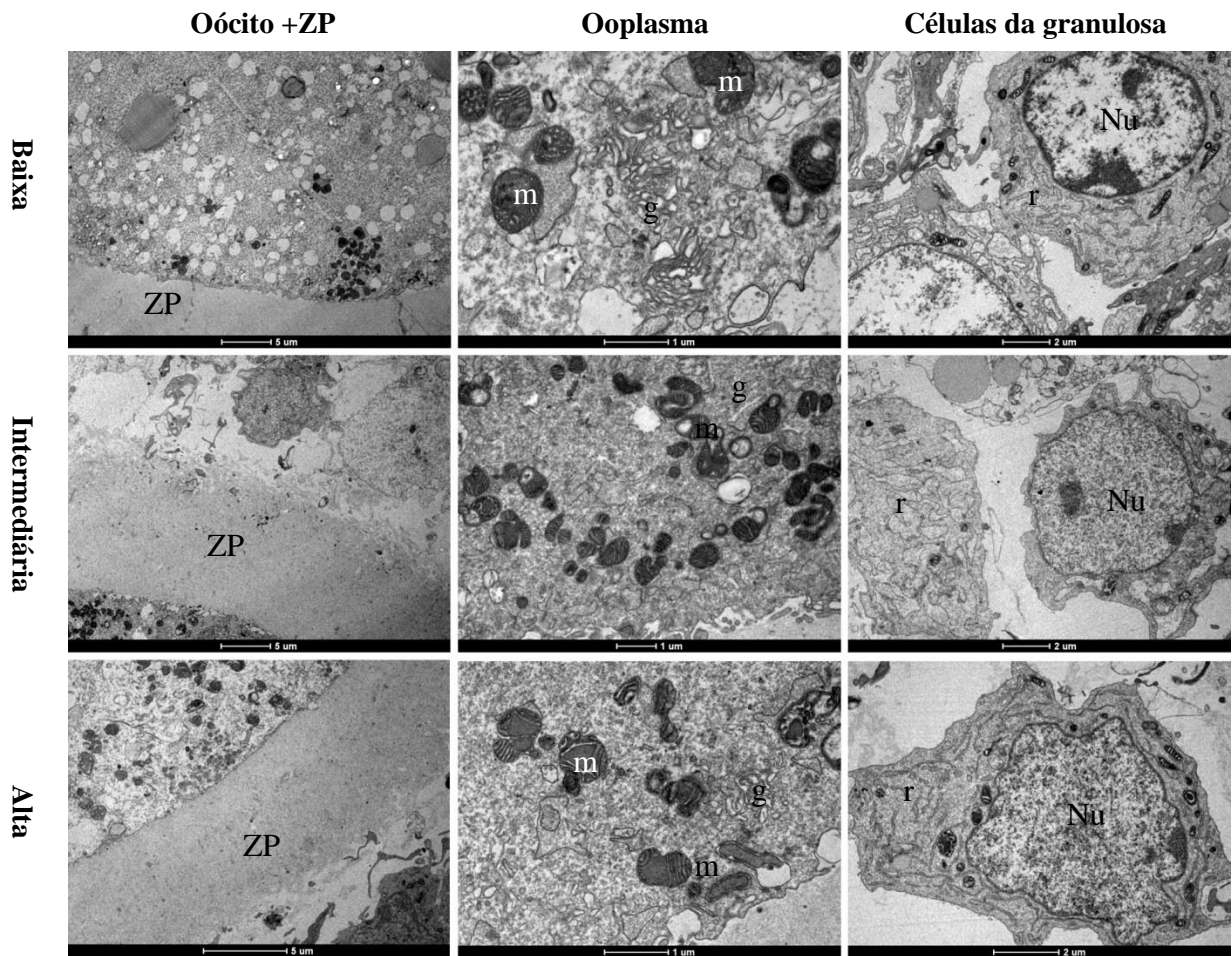


Fig. 4. Micrografia representativa de complexo cumulus oócito (CCOs) nas classes de baixa, intermediária e alta contagem folicular antral (CFA). **ZP:** zona pelúcida; **Nu:** núcleo; **m:** mitocôndria; **g:** complexo de Golgi; **m:** mitocôndrias; **r:** retículo endoplasmático rugoso.

4. Discussão

Em relação à quantidade de folículos primordiais, primários e secundários na classe de CFA alta foi encontrado por Ireland et al. [12] resultado semelhante, que demonstraram que o número de folículos primordiais, em transição, primários, secundários e antrais morfologicamente saudáveis foram inferiores para animais com baixa CFA, comparada com a classe de alta CFA durante as ondas foliculares. Curiosamente, a comparação da média de folículos em cada estágio da foliculogênese entre os grupos revelou que o número total de folículos primordiais normais na classe de baixa CFA foi menor ($P < 0,05$) do que na de CFA alta [15]. Em corroboração, Hodgen [16] afirmou que a alta repetibilidade do padrão de crescimento dos folículos antrais durante as ondas pode ser explicada pelo aumento da taxa de iniciação do recrutamento de folículos primordiais. Desta forma, os resultados confirmam que a quantidade de folículos presentes na reserva ovariana está intimamente relacionada com a classe folicular antral.

Houve correlação positiva entre CFA e número de folículos primordiais normais, degenerados, total e folículos secundários normais e total. Cushman et al. [17]; Scheffer [18]; Ireland et al. [12] confirmaram esta correlação positiva entre o número de folículos primordiais e o número de folículos em crescimento ($r = 0,92$; $P < 0,01$). Tendo em vista que o número de folículos primordiais está relacionado com o número de folículos antrais no ovário bovino, evidencia-se a associação entre reserva ovariana e longevidade reprodutiva. Desta forma, a depleção da população folicular ovariana está associada com a senescência reprodutiva em fêmeas bovinas [15]. Sendo assim, a utilização da CFA em novilhas pode ser um indicador mais preciso da eficiência reprodutiva, pois pode prever o tempo de vida reprodutiva [19].

Os números médios de oócitos de graus II e viáveis diferiram entre as classes de CFA. Similarmente, outros autores demonstraram que o número de oócitos morfologicamente viáveis em animais com baixa CFA foram menores do que em animais com alta CFA [12]. Outro estudo

mostrou correlações positivas ($r=0,753$; $r=0,638$, respectivamente) entre a CFA e reserva ovariana sobre a população total de oócitos recuperados por OPU e oócitos candidatos a fertilização *in vitro* [20]. Além disso, Mercé et al. [21] demonstraram que o número total de folículos presentes no ovário está correlacionado com o número de oócitos recuperados, maduros, fertilizáveis e com o total de embriões ($r=0,86$; $0,66$; $0,56$ e $0,55$, respectivamente).

A quantidade de oócitos grau I e o volume ovariano na classe de alta CFA foram maiores que nas demais classes. O total de oócitos na classe de baixa CFA foi menor do que na classe intermediária. Pode-se inferir que a classe de CFA possui influência do volume ovariano e influencia a qualidade dos oócitos. Estudos anteriores designaram a coleta de oócitos em quatro classes: G1: muito alto, G2: alto, G3: médio e G4: baixa produção de oócitos e demonstraram que fêmeas com maior produção de oócitos produzem maior ($P<0,05$) número de oócitos viáveis ($47,06\pm 1,6$ em G1; $24,95\pm 0,33$ em G2; $15,57\pm 0,26$ em G3; $6,31\pm 0,38$ em G4) [22, 23]. Assim como a CFA, o volume ovariano é um preditor de reserva ovariana [25] e ambos são preditores de sucesso reprodutivo [24]. Modina et al. [15] observaram redução significativa no peso, comprimento e altura de ovários em vacas com baixa CFA ($5,07\pm 0,28$ g; $3,82\pm 0,10$ cm; $1,79\pm 0,06$ cm, respectivamente) comparados às vacas com alta CFA ($13,29\pm 0,68$ g; $4,67\pm 0,09$ cm; $2,69\pm 0,06$ cm, respectivamente). Em consonância, Ireland et al. [12] reportaram que, o peso, comprimento e altura dos ovários em animais com baixa CFA ($3,05\pm 0,33$ g; $23,3\pm 1,4$ e $12,3\pm 1,1$ mm, respectivamente) foram menores do que em animais com alta CFA ($7,11\pm 0,41$ g; $28,3\pm 1,3$ e $15,5\pm 0,8$ mm, respectivamente) durante as ondas foliculares. Além disso, a variação entre os animais nas classes de CFA durante as ondas foliculares foi positivamente correlacionada ($r=0,80-0,90$) com variação no peso ovariano e número total de folículos [12].

A classe de volume ovariano possui relação positiva com a quantidade de CFA total presente no ovário. Corroborando, Kwee et al. [7] demonstraram que a CFA e o volume total do

ovário atuam na predição da resposta ovariana à FIV. Outros estudos correlacionaram positivamente ($r=0,90$) a CFA com o peso ovariano e com o número total de folículos e oócitos saudáveis ($r=0,89$) presentes nos ovários [26, 19]. Além disso, um estudo com humanos mostrou que o número total de oócitos correlacionou-se positivamente ($r=0,958$) com CFA total [25].

Em outros estudos [6, 21] foram demonstrados resultados de correlação entre volume ovariano e grau oocitário. Houve correlação positiva entre o volume ovariano e o número de oócitos de Grau I ($r=0,35$), II ($r=0,25$), III ($r=0,36$) e o número total de oócitos ($r=0,39$). Além disso, a análise de regressão linear foi significativa entre o volume de ovário e o número de oócitos de grau I e número de oócitos de Grau I e II ($R^2=0,16$; $R^2=0,14$) [6]. Todavia, outros estudos associaram volume ovariano com o número de oócitos recuperados, maduros, fertilizáveis e o total de embriões ($r=0,75$; $0,63$; $0,56$ e $0,54$, respectivamente) [21].

É cabível que a alta variabilidade no tamanho da reserva ovariana contribui para a redução no desenvolvimento e/ou qualidade do oócito na fertilidade em mulheres [27] e bovinos [28]. Além disso, sabe-se que a CFA possui correlação altamente significativa com o número de oócitos recuperados e o número de oócitos fertilizados [29]. Em outros estudos foram demonstrados que a proporção de oócitos maturados *in vitro* no grupo com alta CFA foi maior ($P<0,05$) do que a do grupo de baixa [12, 26]. Presume-se que os oócitos da classe de alta CFA possuem maior habilidade de MIV e FIV do que aqueles com baixa CFA. Animais no grupo com baixa CFA também tiveram ~80% menos folículos e oócitos morfolologicamente saudáveis (6016 ± 1685 e 29059 ± 4564 , respectivamente) e ~45% menos folículos morfolologicamente saudáveis e oócitos por grama de ovário (2110 ± 371 e 3869 ± 535 , respectivamente) comparados com animais do grupo com CFA alta [12, 26]. Além disso, essa diferença durante o desenvolvimento meiótico nas classes de CFA pode estar relacionada à alta proliferação de células da granulosa em ovários com CFA alta [30]. Esses resultados podem ser explicados pela

diferença na secreção das gonadotrofinas entre animais das classes de alta e baixa CFA. Menores concentrações de progesterona no sangue foram encontradas em animais com CFA baixa (30-50% menores; 1-5 ng/mL) entre os dias 3 e 14 do ciclo estral comparado com ovários de alta CFA [26, 31]. Além disso, a secreção de gonadotrofinas pode estar cronicamente aumentada durante as ondas foliculares em fêmeas de CFA baixa nos estudos [32, 5, 31]. Provavelmente, devido a dessensibilização ou desacoplamento de receptores de gonadotrofinas em células da granulosa, teca e lúteas [33], a função ovariana seja alterada. Scheetz et al. [34] mostraram que o aumento induzido por FSH na produção de estradiol e Hormônio Anti Mulleriano (AMH), e na expressão de RNAs para a enzima aromatase citocromo P450 19A1 (CYP19A1), receptor de FSH (R-FSH) e do AMH em células de granulosa foram menores em ovários de fêmeas com baixa CFA comparadas as de CFA alta. As células da granulosa em bovinos com baixa CFA são refratárias à ação do FSH, o que poderia explicar porque a função do ovário, a capacidade de resposta à estimulação das gonadotrofinas e a fertilidade diminuem em indivíduos com CFA baixa *versus* alta.

Por outro lado, a análise ultraestrutural de CCOs maduros não foi capaz de mostrar diferenças significativas entre as diferentes classes de CFA. Esse resultado sugere que, provavelmente, as alterações ocorrem no âmbito molecular e não ultraestrutural. Como forma de avaliar a maturação folicular, utilizou-se o trabalho de Dadarwal et al. [35], segundo o qual, a maturação oocitária em bovinos está atrelada à localização das organelas no citoplasma oocitário. No seu estudo, foram analisadas por MET a localização de mitocôndrias, retículos e gotículas lipídicas em folículos em regressão, crescimento, e pré-ovulatórios, mostrando que o número de mitocôndrias aumentou, assim como as gotículas lipídicas foram reorganizadas espacialmente, e a interface entre as mesmas aumentou com a maturação folicular. Os CCOs visualizados no

presente estudo mostraram organização ooplasmática como as observadas por Dadarwal et al. [35] em oócitos pré-ovulatórios.

Em conclusão, a CFA e o volume ovariano são preditores efetivos de oócitos recuperados e da progressão meiótica. Desta forma, a utilização destes marcadores pode auxiliar no maior sucesso da PIVE, por meio da seleção prévia de doadoras com alto potencial produtivo.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada e financiada pela Fazenda Casa Branca Agropastoril, Careçu-MG em parceria com a Universidade Federal do Ceará – UFC, Sobral-CE e o Laboratório de Ultraestrutura da CNPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE. Não houve conflito de interesses que pudesse ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

References

- [1] Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. *Biology Reprod* 2008;79:209–222.
- [2] Takagi M, Kim IH, Izadyar F, Hyttel P, Bevers MM, Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Vos PLAM. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant thuman FSH. *Reproduction* 2001;121:941-951.
- [3] Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31:212-217.
- [4] Lonergan P, Fair T. *In vitro*-produced bovine embryos- dealing with the warts. *Theriogenology* 2008;69:17-22.
- [5] Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 2007;22:1687–1695.
- [6] Penitente-filho JM, Jimenez CR, Zolini AM, Carrascal E, Azevedo JL, Silveira CO, Oliveira FA, Torres CAA. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Anim Sci J* 2015;86:148–152.
- [7] Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with *in vitro* fertilization. *Reprod Biology Endoc* 2007;15:5-9.

- [8] Lowman BGN, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle. Edinburgh: The Edinburgh School of Agriculture 1976: 5p. (East of Scotland College of Agriculture. Bulletin, 6).
- [9] Rodrigues AS, Oliveira SN, Loiola MVG, Ferraz PA, Chalhoub M, Bittencourt RF; Araujo E. AB, Bittencourt TCBSC, Filho ALR. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Ciência Rural* 2015;45:711-717.
- [10] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MV, Celestino JJH, Lopes CA, Correia JC, Verde IB, Matos MH, Bão SN, Name, KP, Campello CC, Silva JR, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:640–647.
- [11] Silva JRV, Van Den Hurk R, Costa SH, Andrade ER, Nunes AP, Lobo RNB, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 2004;81:273-286.
- [12] Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 2008;79:1219–1225.
- [13] Stringfellow DA, Givens MD. Manual of the International Embryo Transfer Society, 4th edn. International Embryo Transfer Society, Champaign, IL. 2010.
- [14] Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. *J Clin Ultrasound*. 1981;9:219-22.
- [15] Modena SC, Tessaro I, Lodde V, Franciosi F, Corbani D, Luciano AM. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 2013;2:235-244.
- [16] Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982;38:281–300.
- [17] Cushman RA, de Souza JC, Hedgpeth VS, Britt JH. Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol Reprod* 1999;60:349–354.
- [18] Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, de Jong FH, te Velde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human Reprod* 2003;18:700–706.
- [19] Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci* 2009;87:1971–1980.
- [20] Lonegro N, Napoli N, Pesce R, Chacón C. Antral follicle count as a predictor of ovarian response. *Rev Argent Radiol* 2016; 80:252-257.
- [21] Mercé LT, Bau S, Barco MJ, Troyano J, Gay R, Sotos F, Villa A. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006;21:1218-26.
- [22] Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, Seneda MM. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim Reprod* 2013;10:180-186.
- [23] Pontes JHF, Melo-Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale

- commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011;75:1640-1646.
- [24] Jaiswar SP, Natu SM, Sujata, Sankhwar PL, Gupta M. Prediction of Poor Ovarian response by Biochemical and Biophysical Markers: A Logistic Regression Model. *J Obst Gynecol India* 2015;6:411–416.
- [25] Bas-Lando M, Rabinowitz R, Farkash R, Algur N, Rubinstein E, Schonberger O, Eldar-Geva T. Prediction value of anti-Mullerian hormone (AMH) serum levels and antral follicle count (AFC) in hormonal contraceptive (HC) users and non-HC users undergoing IVF-PGD treatment. *Gynecol Endocrinol* 2017;28:1-4.
- [26] Ireland, JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. 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* 2011;23:1–14.
- [27] Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T. Aging of oocyte, ovary and human reproduction. *Ann Ny Acad Sci* 2004;1034:117–131.
- [28] Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH. Trends in reproductive performance in southeastern holstein and jersey dhi herds. *J Dairy Sci* 2002;85:244–251.
- [29] Majumder K, Gelbaya TA, Laing I, Nardo LG. The use of anti-mullerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Europ J Obst Gyn Reprod Biol* 2010;150:166–170. 2010.
- [30] Nagai K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of *in vitro*-grown oocytes derived from early antral follicles. *Biomed Res* 2016;37:63-71.
- [31] Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JLH, Smith, GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol Reprod* 2009;80:1272–1281.
- [32] Burns DS, Jimenez-Krassel FJ, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals. very high repeatability in individuals and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 2005;73:54–62.
- [33] Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R. Mechanisms of gonadotrophin desensitization. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:69–74.
- [34] Scheetz D, Folger JK, Smith GW, Ireland JJ. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:327–336.
- [35] Dadarwal D, Adams GP, Hyttel P, Brogliatti GM, Caldwell S, Singh J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. *Reprod Biol Endoc* 2015;13:1-11.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 02 - RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO *IN VITRO* E CARACTERÍSTICAS DE FERTILIDADE EM FÊMEAS *BOS TAURUS TAURUS* E *BOS TAURUS INDICUS***

Artigo formatado segundo as normas da revista *Animal Reproduction Science*

Relação entre produção *in vitro* e características de fertilidade em fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*

G. L. Vasconcelos^a, E. V. Cunha^b, R. Maculan^a, Jesús Alfonso Sánchez Viafara^a, J. R. V. Silva^b,
J. C. Souza^{a,*}

^aAnimal Science Department, Federal University of Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

^bBiotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

*Corresponding address (J. C. Souza): Animal Science Department, Federal University of Lavras, Câmpus Universitário, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil, Caixa Postal 3037.

Phone/Fax: +55 35 3829-1231 [jcamisao@yahoo.com.br]

Resumo

Os efeitos da raça, da contagem folicular antral (CFA) e da classe de largura vulvar (LV) sobre as características reprodutivas, produção *in vitro* e viabilidade de embriões em fêmeas bovinas foram analisados. Fêmeas das raças Brahman (*Bos indicus*) e Simental (*Bos taurus*) foram agrupadas nas classes de CFA alta (≥ 50 e ≥ 25 folículos, respectivamente); intermediária (> 30 e ≤ 49 ; > 16 e < 24 folículos, respectivamente) e baixa (< 30 e ≤ 15 folículos, respectivamente) e classe de LV grande (> 123 mm e 80 mm, respectivamente); média (> 102 mm e ≤ 123 mm; > 65 mm e ≤ 80 mm, respectivamente) e pequena (≤ 102 mm e ≤ 65 mm, respectivamente) em *Bos*

indicus e Bos taurus. O número de oócitos viáveis ($17,23 \pm 0,41$ e $12,15 \pm 0,46$), o total de embriões ($6,89 \pm 0,26$ e $2,50 \pm 0,21$), a eficiência na produção de embriões ($38,37 \pm 0,62$ e $22,43 \pm 0,62$), a porcentagem de prenhez ($38,40 \pm 0,83$ e $29,67 \pm 0,91$) e a porcentagem na eficiência de oócitos viáveis em relação à prenhez ($12,61 \pm 0,48$ e $8,84 \pm 0,52$) na raça Brahman foram superiores ($P < 0,05$) à Simental. O número médio de blastômeros na classe de CFA alta ($188,37 \pm 1,32$) foi superior ($P < 0,0001$) às demais (intermediária: $137,97 \pm 1,32$ e baixa: $110,33 \pm 1,32$). Pode-se concluir que a CFA e LV são características indicadoras na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: contagem folicular antral, largura vulvar, fertilidade reprodutiva, seleção genética.

Introdução

Apesar dos muitos esforços para melhorar a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a sua eficiência ainda é relativamente baixa. Apenas 35-40% dos oócitos bovinos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (Sirard et al., 2006). E, dentre estes, somente 30% chegam a ser transferidos para receptoras (Park et al., 2005).

Sabe-se que a baixa eficácia da PIVE é influenciada principalmente pela retirada do oócito de seu ambiente natural e pelos fatores ambientais associados à PIVE. Além disso, fatores como alteração no desenvolvimento *in vitro* oocitário e embrionário, estão associados às diferenças fisiológicas analisadas no decorrer da vida de fêmeas doadoras, levando à diferenças na competência *in vitro* oocitária e na produção *in vitro* de blastocistos entre as doadoras bovinas. Embora muitos desses fatores sejam desconhecidos, deve-se considerar que o desenvolvimento

do oócito/embrião é diferenciado entre as características de fertilidade consideradas na seleção genética nos rebanhos (Ireland et al., 2007, 2008, 2011).

A produção de embriões de fêmeas oriundas de rebanhos elites pode ser mais eficiente quando associada à seleção de animais com características indicadoras de fertilidade (CIF) de fácil mensuração, como contagem folicular antral (CFA) e classe de largura vulvar (LV). Sabe-se que há correlação positiva entre o número de folículos primordiais e o número de folículos em crescimento, e que o número de folículos primordiais está relacionado com o número de folículos antrais no ovário bovino, sugerindo a associação entre a reserva ovariana e longevidade reprodutiva (Cushman et al., 1999; Ireland et al., 2008). Sendo assim, a proposta da utilização desses fenótipos deve ser considerada em modelos que pretendem ser aplicados na seleção para a fertilidade (Mesquita et al., 2016; Maculan, 2015, dados não publicados; Chacur et al., 2006).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para analisar embriões após a PIVE, a fim de se obter maior precisão sobre a viabilidade, as quais a Microscopia de Fluorescência, que utiliza corante de DNA específico para quantificar blastômeros de embriões produzidos *in vitro* (Costa et al., 2010). No entanto, a possível relação da CFA e da LV com a produção *in vitro* e viabilidade de embriões bovinos ainda não foi estudada.

Hipotetizou-se que fêmeas *Bos indicus* possuem maiores CFA, larguras vulvares, oócitos viáveis, total de embriões e prenhezes que fêmeas *Bos taurus*. Fêmeas com CFA alta e LV grande possuem maior número de oócitos viáveis, total de embriões e prenhezes do que fêmeas com CFA baixa e LV pequena. Oócitos de fêmeas com CFA alta resultam em embriões com maior número de células embrionárias do que oócitos de fêmeas com baixa CFA. Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da raça, CFA e LV sobre as características reprodutivas e analisar a quantidade de blastômeros embrionários produzidos *in vitro* de fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos e protocolos relacionados com animais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no uso de animais (Comissões Permanentes/PRP- UFLA) da Universidade Federal de Lavras- MG, Minas Gerais, Brasil com protocolo de nº (068/14). Todos os reagentes foram da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), a não ser que indicado de outra forma no texto.

Experimento 1- Avaliação da contagem folicular antral e morfometria da genitália externa

Animais e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da fazenda Casa Branca Agropastoril, Careaçú-MG, Brasil. Vacas de corte (n= 283) das raças Brahman (n=184) e Simental (n=99) foram utilizadas para identificar diferenças entre as raças quanto à CFA e a CLV. As fêmeas Brahman e Simental possuíam idades variadas (3-10 anos e 2-13 anos, respectivamente com média de 6 anos) e pesos entre 337-774 kg (média= 539 kg) e 344-803 kg (média= 546 kg); respectivamente. Todas as fêmeas eram cíclicas, múltíparas e com condição corporal entre 3 e 4 (1-magra a 5-obesa) (Lowman, Scott, Somerville, 1976) e permaneceram em pastagem de *Brachiaria* spp, com suplementação de silagem de milho, sal mineral *ad libitum* e ração concentrada fornecida na proporção corporal 1,5 % do peso.

Contagem folicular antral (CFA)

A contagem dos folículos antrais maiores ou iguais a 3mm de diâmetro de ambos os ovários foi realizada por ultrassonografia transretal (Aloka 500) com transdutor linear em 5.0 MHz em modo B. Fêmeas *Bos indicus* foram classificadas de acordo com a CFA em: alta (≥ 50

folículos; n=37); intermediária (30 – 49 folículos; n=70) e baixa (<30 folículos; n=76) (Rodrigues et al., 2015). Já fêmeas *Bos taurus* foram classificadas em: CFA alta (≥ 25 folículos; n=39); intermediária (16- 24 folículos; n=16) e baixa (≤ 15 folículos; n=44) (Ireland et al., 2007; Burns et al., 2005).

Morfometria da genitália externa

A morfometria da largura vulvar foi considerada como a distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus (Figura 1). Baseado na distribuição de frequência dos valores obtidos para classe de largura vulvar (LV) em Brahman e Simental, classificou-se de maneira inédita em grande (G), média (M) e pequena (P): sendo grande ($> 123\text{mm}$; n = 36); média ($> 102\text{mm}$ e $\leq 123\text{mm}$; n=35) e pequena ($\leq 102\text{mm}$; n = 38) na raça Brahman e grande ($> 80\text{ mm}$; n = 22); média ($> 65\text{mm}$ e $\leq 80\text{mm}$; n = 29) e pequena ($\leq 65\text{mm}$; n = 20) na raça Simental; onde n remete ao número de animais por classe. A morfometria foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (150mm/0,01mm Powerfix Nf, Digimess, São Paulo, BR).



Figura 1. Largura vulvar medida com paquímetro digital.

Fonte: Mesquita et al., 2016.

Aspiração Folicular Ovariana Guiada por Ultrassom (OPU-Ovum pick-up)

Em média três sessões de OPU foram realizadas em todos os animais, com um intervalo de 21 dias entre as sessões. As OPUs foram realizadas com um equipamento de ultrassom Aloka SSD-500 (Aloka, Mure, Japão), um transdutor convexo de 5 MHz e uma bomba de sucção a vácuo com pressão negativa entre 85 e 90 mmHg e taxa de fluxo de 15-20 mL/min. Foram utilizadas agulhas de aspiração 17G (WTA, Sertãozinho, SP) ligadas à linhas de aspiração (WTA, Sertãozinho, SP) conectadas a um tubo de 50 mL (Falcon™). Todos os folículos antrais visíveis (≥ 3 mm de diâmetro) foram aspirados por OPU (Burns et al., 2005; Ireland et al. 2008). O meio de lavagem consistiu em Dulbecco's salina tamponada fosfatada (DPBS) suplementado com 36 mg/mL de piruvato de sódio, 50 mg/ mL de gentamicina, 0,5 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 10 UI/mL de heparina. Os complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados foram lavados com DPBS suplementado e 1% (v/v) de solução de penicilina-estreptomicina (5000 UI/ml de penicilina G sódica e 5000 mg/ mL de estreptomicina). Os CCOs foram lavados três vezes em meio 3-Hepes básico modificado (mBM3-Hepes) e, avaliados morfológicamente. Somente CCOs com, pelo menos, duas camadas compactas de células da granulosa e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis e utilizados para posterior processamento.

Maturação in vitro (MIV) de CCOs bovinos

CCOs viáveis foram colocados em gotas de 90 μ l de meio de maturação (máximo 30 oócitos/gota) que consiste em *Tissue Culture Medium* (TCM-199) suplementado com 22 μ g/mL de piruvato de sódio, 5 μ g/mL de FSH bovino, 10 UI/mL de LH, 20 μ g/mL de estradiol, 20 mg/mL de amicacina e 10% de soro fetal bovino (SFB), e equilibrado em incubadora durante pelo menos 2 h. A MIV de CCOs foi realizada durante 24 h a 38,7°C com 5% de CO₂ numa atmosfera umidificada.

Fertilização in vitro (FIV) e Cultivo in vitro de embriões (CIVE) bovinos

CCOs maturados *in vitro* foram lavados três vezes em meio TCM-199 e, em seguida, transferidos para gotas de 60µl de meio de fertilização Ferti-TALP (10-15 oócitos/gota) sob óleo mineral. O meio de fertilização consistiu em meio Ferti-TALP suplementado com 0,6 g/L de BSA, 20 µg/mL de piruvato de sódio, 440 µg/mL de PHE (0,5 mM penicilamina, 0,25 mM hipotaurina e 24 µM epinefrina), 10 UI/mL de heparina e 20 mg/mL de amicacina. Sêmen congelado de um touro (por raça) com fertilidade comprovada para a FIV foi utilizado durante todo o experimento. O processo de separação de Percoll foi empregado para filtrar os espermatozoides viáveis. A co-incubação de espermatozoides/oócitos teve duração de 18 a 22 horas a 38,7°C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Depois disso, os prováveis zigotos foram desnudados por vortex, lavados quatro vezes em meio Fert-TALP antes de serem transferidos para gotas de 60µl de meio CR2 durante 48 horas a 38,7°C em ambiente controlado de 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. Dois dias após o início do cultivo *in vitro*, metade do meio CR2 foi trocado. Os embriões foram examinados sete dias após a FIV usando óptica Nomarski (200-400 ampliação) em microscópio Nikon Diaphot DTM (Nikon, Tokyo, Japan).

Transferência de embriões e diagnóstico de prenhez

As receptoras foram sincronizadas e no dia 18 realizou-se a transferência de embriões nas receptoras. Após a transferência, a prenhez foi determinada aos 40 dias após a transferência. Analisou-se o efeito da raça, classe de CFA e largura vulvar sobre os números de oócitos viáveis (OV), total de embriões (TE), porcentagem de eficiência da produção de embriões *in vitro* (EPE), número de prenhez (P), taxa de prenhez (%P) e a porcentagem de eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez (%OV/P). A EPE foi calculada pela divisão do número total

de embriões pelo número de oócitos viáveis multiplicado por 100 e a %OV/P foi calculada pela divisão do número de prenhez pelo número de oócitos viáveis multiplicado por 100.

Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SAS® (SAS, Cary, NC, EUA). Foram criadas classes de CFA e largura vulvar baseadas nas respectivas distribuições de frequência. Os dados gerais foram testados para a normalidade pelo teste Shapiro Wilk de acordo com o procedimento UNIVARIATE, e quando necessário, transformados para atingir a normalidade. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para avaliar os efeitos de raça, classe de CFA e largura vulvar sobre os números médios de OV, TE, EPE, P, %P e a %OV/P. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

Experimento 2- Avaliação do número de blastômeros de embriões bovinos produzidos in vitro de fêmeas com alta, intermediária e baixa CFA

Avaliação da qualidade embrionária por microscopia de fluorescência

No dia 7 do cultivo *in vitro*, um total de 90 embriões em estágio de blastocisto foram obtidos nas três classes (n=30: alta, n= 30: intermediária, n=30: baixa) de CFA. Os embriões foram corados com Hoechst 33342 (triclórídrico bisbenzimidazolo (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1Hbenzimidazole trihydrochloride trihydrate)) para contagem dos núcleos celulares usando o software NIS elements 2.4 (Nikon, Nikon Instruments Inc., Americas). Esse corante tem a propriedade de atravessar a membrana celular se ligando principalmente aos nucleotídeos adenina e timina da molécula de DNA, a qual quando exposta a luz ultravioleta

emite fluorescência azul de comprimento de onda de 568 nm. Desta forma, é possível avaliar o núcleo de células vivas ou fixadas (Thermo Fisher Scientific, 2012). Em placa de quatro poços, incubou-se os blastocistos em gotas de 10 µl contendo 10µg/ml de Hoechst 33342 a 37°C durante 15 min em ambiente escuro. Em seguida, os blastocistos foram inseridos em lâminas e cobertos com lamínula para visualização no microscópio de fluorescência DMLB (Leica DMI4000B) com aumento de 200X, equipado com filtro UV.

Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema SAS® (SAS, Cary, NC, EUA). O procedimento GLIMMIX foi utilizado para avaliar os efeitos de classe de CFA sobre as características reprodutivas avaliadas no estudo. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

Resultados

Experimento 1- Avaliação da contagem folicular antral e morfometria da genitália externa

O número de OV, TE, %EPE, número de prenhez, taxa de prenhez e %OV/P na raça Brahman foram superiores ($P < 0,0001$) à Simental (Tab.1).

Tabela 1. Efeito da raça sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.

RAÇA	N	OV	TE	%EPE	P	%P	%OV/P
Brahman	184	17,23±0,41 ^a	6,89±0,26 ^a	38,37±0,62 ^a	1,95±0,18 ^a	38,40±0,83 ^a	12,61±0,48 ^a
Simental	99	12,15±0,46 ^b	2,50±0,21 ^b	22,43±0,62 ^b	1,12±0,17 ^b	29,67±0,91 ^b	8,84±0,52 ^b

OV: número de oócitos viáveis; **TE:** total de embriões; **%EPE:** porcentagem de eficiência de embriões; **P:** número de prenhez; **%P:** taxa de prenhez; **%OV/P:** porcentagem da eficiência de oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

O número de OV na classe de CFA alta foi superior ($P < 0,0001$) às demais classes. Além disso, a classe intermediária foi superior ($P < 0,0001$) à classe baixa. O TE na classe de alta e intermediária foram superiores ($P < 0,0001$) à classe de baixa CFA. O %EPE na classe intermediária foi superior ($P = 0,002$) às outras classes de CFA. A taxa de prenhez e %OV/Q na classe baixa foram superiores ($P < 0,05$) às demais classes de CFA (Tab.2).

Tabela 2. Efeito da contagem folicular antral (CFA) sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.

CFA	N	OV	TE	%EPE	P	%P	%OV/P
Alta	76	19,52±0,62 ^a	5,59±0,35 ^a	28,07±0,75 ^b	1,70±0,25 ^a	32,99±1,08 ^b	8,90±0,55 ^b
Intermediária	86	14,36±0,65 ^b	4,75±0,42 ^a	31,91±1,05 ^a	1,56±0,27 ^a	31,84±1,22 ^b	9,74±0,67 ^b
Baixa	120	10,81±0,40 ^c	2,70±0,22 ^b	28,20±0,65 ^b	1,22±0,17 ^a	36,61±0,92 ^a	13,59±0,56 ^a

CFA: Contagem folicular antral; **OV:** número de oócitos viáveis; **TE:** total de embriões; **%EPE:** porcentagem de eficiência de embriões; **P:** número de prenhez; **%P:** taxa de prenhez; **%OV/P:** porcentagem da eficiência dos oócitos

viáveis em relação à quantidade de prenhez. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

O número de OV e TE na classe de largura vulvar pequena foi inferior ($P < 0,0001$) à média. A taxa de prenhez nas classes de grande e média LV foram superiores ($P < 0,0001$) à pequena. O % OV/P na classe média foi superior ($P < 0,05$) as demais classes de LV. Além disso, o %OV/P na classe grande LV foi maior ($P < 0,0001$) do que na pequena CLV (Tab.3).

Tabela 3. Efeito da classe de largura vulvar (LV) sobre a produção de oócitos, embriões e prenhez.

CLV	N	OV	TE	%EPE	P	%P	%OV/P
Grande	58	14,51 \pm 0,53 ^{ab}	4,21 \pm 0,31 ^{ab}	29,68 \pm 0,77 ^a	1,41 \pm 0,20 ^a	35,58 \pm 1,03 ^a	11,63 \pm 0,59 ^b
Média	64	15,72 \pm 0,52 ^a	4,59 \pm 0,30 ^a	29,11 \pm 0,73 ^a	1,84 \pm 0,25 ^a	37,14 \pm 1,06 ^a	13,75 \pm 0,64 ^a
Pequena	58	13,28 \pm 0,58 ^b	3,71 \pm 0,34 ^b	29,23 \pm 0,85 ^a	1,25 \pm 0,22 ^a	29,10 \pm 1,00 ^b	7,36 \pm 0,50 ^c

CLV: classe de largura vulvar; OV: número de oócitos viáveis; TE: total de embriões; %EPE: porcentagem de eficiência de embriões; P: número de prenhez; %P: taxa de prenhez; %OV/P: porcentagem da eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Houve efeito da interação entre raça e CFA ($P < 0,0001$), sendo que, na raça Brahman, o número de OV na CFA alta foi maior ($P < 0,0001$) comparada às demais. O número de OV em vacas Brahman de CFA intermediária foi maior ($P = 0,0003$) do que na classe baixa. Porém na raça Simental, o número de OV da classe CFA alta não diferiu ($P = 0,28$) do número de OV na intermediária (Fig. 2A). O TE em vacas Brahman de CFA alta foi superior ($P < 0,01$) às demais

classes (média: $P=0,0008$; baixa: $P<0,0001$). O TE de vacas Brahman da classe intermediária foi superior ($P<0,0001$) ao TE de vacas de CFA baixa. Porém, na raça Simental, o TE da CFA alta não diferiu ($P=0,95$) do observado na classe intermediária (Fig. 2B). O %EPE de vacas Brahman de CFA intermediária foi superior ($P<0,0001$) às demais classes (alta: $P=0,0007$; baixa: $P<0,0001$). O %EPE de vacas Brahman da classe CFA alta foi superior ($P=0,002$) à classe baixa. Porém, na raça Simental, o %EPE da classe CFA baixa foi superior ($P=0,01$) ao observado na classe CFA alta (Fig. 2C). O número de prenhez nas vacas Brahman com alta CFA foi superior ($P=0,05$) à de vacas com baixa CFA, porém, na raça Simental, o número de prenhez não foi diferente entre as classes (Fig. 2D). A taxa de prenhez em vacas da raça Brahman não diferiu ($P>0,05$) entre as classes de CFA, porém, na raça Simental a taxa de prenhez de vacas na classe CFA baixa foi superior à observada nas demais (alta: $P=0,0006$; intermediária: $P=0,0003$; Fig. 2E). O %OV/P em vacas Brahman com alta CFA foi inferior à observada nas demais classes (intermediária: $P=0,03$; baixa: $P=0,05$). Já na raça Simental, o %OV/P em vacas com CFA baixa foi superior ($P<0,0001$) às demais classes (Fig. 2F).

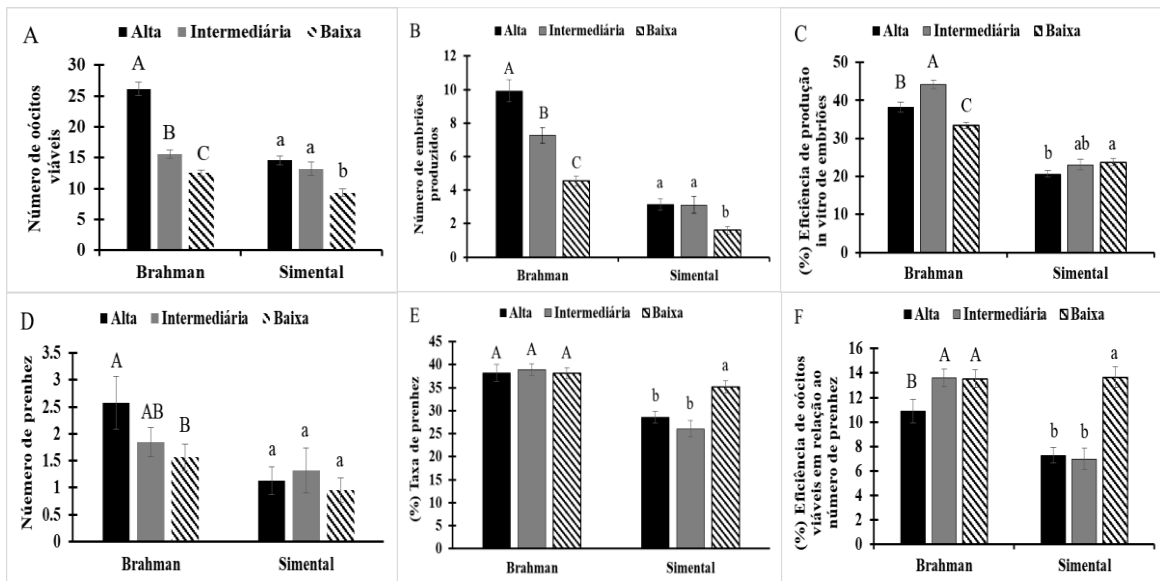


Figura 2. Efeito da interação entre raça (Brahman e Simental) e classe de contagem folicular antral (Alta, Intermediária e baixa; A-F) sobre número de oócitos viáveis (OV), total de embriões (TE), porcentagem de eficiência de embriões (%EPE), número de prenhez (P), taxa de prenhez (%P), porcentagem da eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez (%OV/P). Letras maiúsculas entre as classes de CFA na raça Brahman e letras minúsculas entre as classes na raça Simental indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Houve efeito da interação entre raça e classe de LV ($P = 0,0002$). Na raça Brahman o número de OV não diferiu entre as classes de largura vulvar. Já na raça Simental, o número de OV na classe de LV pequena foi inferior às demais classes (grande: $P = 0,006$; média: $P < 0,0001$; Fig. 3A). O TE em vacas Brahman não diferiu entre as classes de LV. Na raça Simental de classe de LV média, o TE foi superior ($P = 0,05$) ao observado na pequena (Fig. 3B). O %EPE em vacas Brahman de classe de LV média foi superior ($P < 0,0001$) à classe grande. Já na raça Simental, a

classe grande foi superior ($P=0,04$) à média (Fig. 3C). Dependendo da raça, o efeito da classe de LV sobre o %EPE é oposto. O número de prenhez em animais Brahman da classe de LV média foi superior às demais (grande: $P=0,02$; pequena: $P=0,008$). Na raça Simental, não houve diferença ($P>0,05$) entre as classes de LV (Fig. 3D). A taxa de prenhez em vacas da raça Brahman da classe de LV média foi superior ($P<0,0001$) às demais. Já na raça Simental, a classe de LV grande foi superior as demais (média: $P=0,0171$; baixa: $P=0,004$; Fig. 3E). O %OV/P em animais da raça Brahman da classe de LV média foi superior às demais (grande: $P=0,01$; pequena: $P<0,0001$). Na raça Simental, a %OV/P em vacas de classe de LV grande não diferiu ($P>0,05$) da de vacas da classe de LV média, mas ambas as categorias de LV, grande e média, foram superiores ($P<0,05$) à observada na pequena (Fig. 3F).

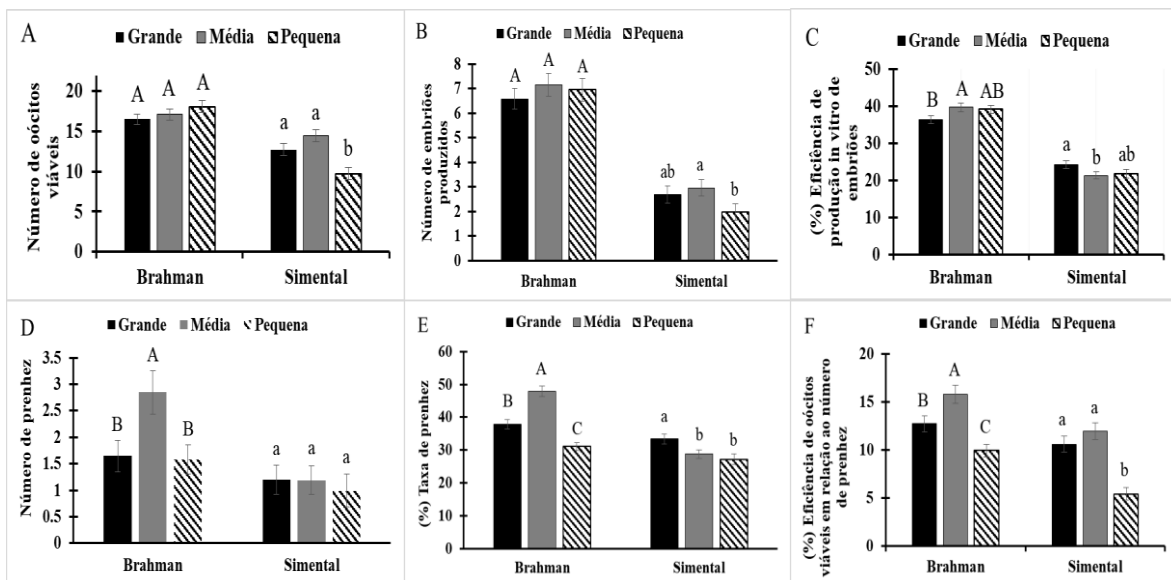


Figura 3. Efeito da interação entre raça (Brahman e Simental) e classe de largura vulvar (Grande, média e pequena- A-F) sobre número de oócitos viáveis (OV), total de embriões (TE), porcentagem de eficiência de embriões (%EPE), número de prenhez (P), taxa de prenhez (%P), porcentagem da eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez (%OV/P).

Letras maiúsculas entre as classes de CFA na raça Brahman e letras minúsculas entre as classes na raça Simental indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Experimento 2- Avaliação do número de blastômeros de embriões bovinos produzidos in vitro de vacas com alta, intermediária e baixa CFA

O número médio de blastômeros na classe de alta CFA foi superior ($P < 0,0001$) ao observado nas demais classes. Além disso, a quantidade de blastômeros na classe intermediária foi superior ($P < 0,0001$) à observada na classe com baixa CFA (Fig. 4; Tab. 4).

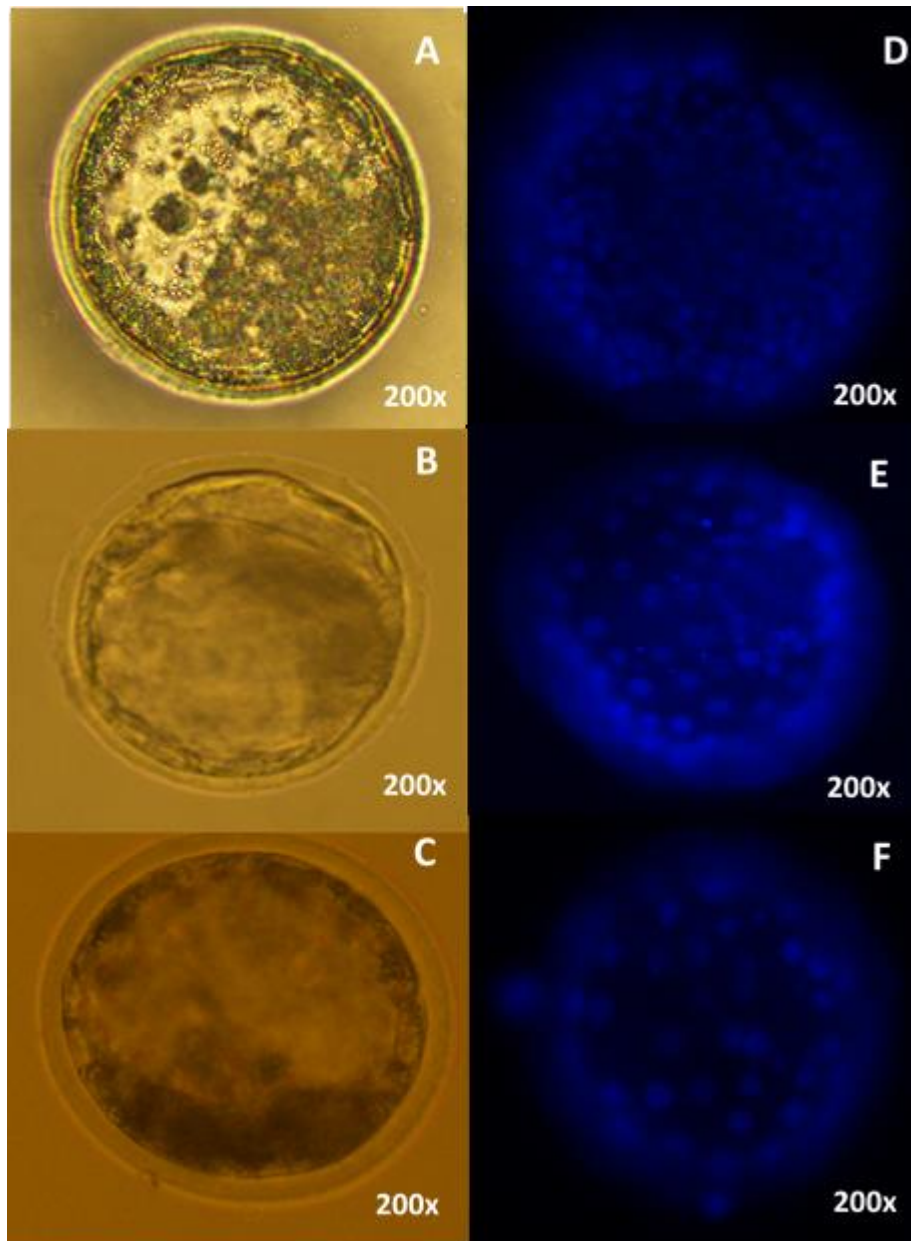


Figura 4. Fotomicrografia de embriões bovinos para avaliação do número de células (blastômeros) sob microscópio de fluorescência. A-D) Embrião com ± 180 células na classe de contagem folicular antral (CFA) alta; B-E) Embrião com ± 130 células na classe de CFA intermediária e C-F) Embrião com ± 110 células na classe de CFA baixa. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 568 nm. Aumento 200X.

Tabela 4. Número de blastômeros em embriões produzidos a partir de oócitos aspirados de vacas com alta, intermediária e baixa contagem folicular antral (CFA).

CFA	N	NBLAST	Valor de P
Alta	30	188,37±1,32 ^a	<0,0001
Intermediária	30	137,97±1,32 ^b	<0,0001
Baixa	30	110,33±1,32 ^c	<0,0001

CFA: Contagem folicular antral; NBLAST: Número médio de blastômeros. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Discussão

O número de folículos antrais na raça Brahman foi superior à Simental, evidenciando as diferenças entre CFA em vacas taurinas e zebuínas. O número médio (\pm SD) de folículos antrais foram de (35 \pm 9) para Nelores e (38 \pm 6) para cruzadas (Nelore x Angus) no grupo com CFA alto e (10 \pm 3) para Nelores e (12 \pm 2) para mestiços (Nelore x Angus) da classe com baixa CFA (Silva-Santos et al., 2014a). Estes resultados mostram a diferença na CFA devido ao grupo genético. Os resultados do presente experimento mostram que a largura vulvar na raça Brahman foi superior à Simental, no entanto, não existem dados na literatura comparando esse fenótipo em fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Mesquita et al. (2016) classificaram medidas de fêmeas da raça Tapabuã em grande ($>7,5$ cm), média (>5 e $\leq 7,5$ cm) e pequena (≤ 5 cm). Apesar dos poucos relatos na literatura sobre a mensuração da genitália externa, a raça Brahman parece possuir maior largura vulvar comparativamente a raça Tabapuã. Desta forma, parece haver grande variação nessa medida entre animais de diferentes raças zebuínas. Já em taurinos, inexistem relatos na literatura sobre a morfometria da genitália externa. No presente estudo, classificou-se medidas de larguras vulvares

para fêmeas da raça Simental em grande (> 80 mm); média (> 65 mm e ≤ 80 mm) e pequena (≤ 65 mm) largura vulvar.

A associação entre a largura vulvar e a CFA foi relatada em um recente estudo. Mesquita et al. (2016) mostraram que a CFA foi menor em fêmeas da raça Tapabuã com largura vulvar grande ($34,88 \pm 3,50$) que em fêmeas com pequena ($45,71 \pm 2,57$) e média ($42,45 \pm 2,45$) largura vulvar. No presente estudo, essa relação foi diferente, sendo que, fêmeas com CFA alta possuíram larguras vulvares maiores ($44,29 \pm 0,87$) comparada com média ($35,86 \pm 0,75$) e pequena ($27,46 \pm 0,69$) largura vulvar. Diante disso, pode-se supor que existe variação entre a associação proposta de acordo com a raça avaliada. Entretanto, são necessários mais estudos que avaliem outros fatores (idade, presença de cio, número de partos, dias que antecedem e sucedem o parto) que podem interferir na medida da largura vulvar.

A contagem de folículos antrais na classe de largura vulvar grande foi superior à pequena. Sabe-se que o número de folículos antrais é amplamente determinado pela reserva ovariana, que é definida como estimativa dos folículos ovarianos capazes de ovular e produzir oócitos fertilizáveis que posteriormente resultam em prenhez saudável e bem-sucedida (Ireland et al., 2011; Satwik et al., 2012). Estudo recente demonstrou que a CFA foi maior em fêmeas com maior largura vulvar relativa comparada com menor largura vulvar ($20,08 \pm 1,36$ e $11,16 \pm 1,60$, respectivamente), podendo afirmar que a largura vulvar relativa com o tamanho corporal é boa preditora de reserva folicular em fêmeas bovinas (Mesquita et al., 2016). Além disso, a largura vulvar foi maior em fêmeas de classe com alta CFA ($8,81 \pm 0,12$ cm) comparada com média e baixa largura vulvar ($8,42 \pm 0,11$ cm e $8,38 \pm 0,13$ cm; Maculan, 2015, dados não publicados). Através desses dados pode-se verificar que a largura vulvar foi facilmente associada a CFA e provavelmente refletem a fertilidade (Mesquita et al., 2016).

O tamanho de estruturas do trato reprodutor feminino pode influenciar a fertilidade das fêmeas (Modina et al., 2013; Ireland et al. 2011; Cushman et al., 2009; Ireland et al., 2008). Mesquita et al. (2016) mostraram que ovários pequenos de fêmeas da raça Tabapuã tiveram menores CFAs ($17,18 \pm 1,76$) que ovários médios ($21,35 \pm 1,81$) e grandes ($24,90 \pm 1,24$). Resultados similares foram relatados em *Bos taurus taurus* (Modina et al., 2013; Ireland et al. 2011; Cushman et al., 2009; Ireland et al., 2008). Cushman et al. (2009) observaram correlação baixa ($r = 0,05$), porém positiva entre o peso do ovário e CFA em novilhas neonatais, sendo que esse padrão perdura até à maturidade reprodutiva. Modina et al. (2013) mostraram redução significativa no peso, comprimento e altura ($5,07 \pm 0,28$ g; $3,82 \pm 0,10$ cm e $1,79 \pm 0,06$ cm, respectivamente) em ovários com baixa ($4,51 \pm 0,32$) comparado com alta ($31,93 \pm 1,67$) CFA ($13,29 \pm 0,68$ g; $4,67 \pm 0,09$ cm e $2,69 \pm 0,06$ cm, respectivamente). Em consonância, Ireland et al. (2008) observaram que, o peso, o comprimento e a altura ($3,05 \pm 0,33$ g; $23,3 \pm 1,4$ e $12,3 \pm 1,1$ mm, respectivamente) dos ovários de animais com CFA baixa (≤ 15) foram menores que CFA alta (≥ 25) ($7,11 \pm 0,41$ g; $28,3 \pm 1,3$ e $15,5 \pm 0,8$ mm, respectivamente) CFA. Além disso, a variação entre os animais nas classes de CFA foi positivamente correlacionada ($r = 0,80-0,90$) com variação no peso ovariano e número total de folículos (Ireland et al., 2008). Diante desses relatos, é evidente a associação entre o volume ovariano e a CFA. Desta forma, hipotetizou-se que poderia haver uma possível relação entre CFA e outras medidas do trato reprodutor como a largura vulvar. Entretanto, os poucos estudos realizados demonstraram resultados não elucidados e novas pesquisas precisam ser realizadas.

A medida da largura vulvar é bastante variável entre indivíduos sendo que, observa-se uma maior variação em fêmeas *Bos taurus indicus* em comparação com *Bos taurus taurus*. No presente estudo, as medidas de larguras vulvares em fêmeas da raça Brahman seguiram um padrão de distribuição normal e variaram de 69,95 a 153,20 mm (média: $106 \pm 14,06$ mm). Em

fêmeas Tabapuã, as larguras vulvares variaram de 4,20 a 17,07 cm (média: $8,57 \pm 1,72$ cm) e 4,85 a 17,79 cm (média: $9,80 \pm 0,18$ cm), respectivamente (Maculan et al., 2015, dados não publicados). No presente estudo, as larguras vulvares em fêmeas da raça Simental foram de 45,93 a 99,24mm (média: $71,91 \pm 9,79$). Inexistem dados na literatura que possibilitam a comparação entre as mensurações observadas em fêmeas *Bos taurus taurus*.

Neste estudo, o número de oócitos viáveis, total de embriões, eficiência da produção de embriões *in vitro* e eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez na raça Brahman foram superiores à Simental. A competência de desenvolvimento dos oócitos e embriões está ligada ao mérito genético da fertilidade das vacas doadoras. Desta forma, a seleção de vacas doadoras é de suma importância para um programa OPU-PIVE, tendo em vista a otimização do número de oócitos e embriões viáveis produzidos (Ireland et al., 2008, 2011; Silva-Santos et al., 2014b). Sabe-se que a capacidade genética materna para responder à superovulação foi um fator importante que influenciou a eficiência do desenvolvimento embrionário precoce (Govignon et al., 2000), bem como a taxa de prenhez em fêmeas (McMillan e Donnison 1999). Estudos mostraram que vacas *Bos indicus* possuem mais ondas foliculares, maior número de folículos por onda folicular, recrutam maior número de folículos por onda de crescimento ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$; Carvalho et al., 2008) com maior número de oócitos recuperados por aspiração folicular (de 3 a 4 vezes maior; Viana et al., 2000) que vacas *Bos taurus*. A média de oócitos recuperados por aspiração folicular é maior para fêmeas zebuínas (18 a 25 oócitos; Watanabe et al., 1999; Thibier et al., 2004) do que para taurinas (4 e 14 oócitos por sessão de OPU; Martins Jr et al., 2007). Vacas *Bos indicus* possuem maior número de oócitos por aspiração folicular ($37,1 \pm 2,6$ vs. $15,4 \pm 1,2$) e total de embriões produzidos *in vitro* ($7,3 \pm 0,9$ vs. $1,1 \pm 0,2$) que vacas *Bos taurus* (Baruselli et al., 2012). Fêmeas *Bos taurus* com baixa CFA possuem menor número de embriões produzidos *in vitro* quando comparadas com fêmeas com CFA alta (1,3 vs. 4,9

embriões; Ireland et al., 2007). Outro estudo mostra que o total de oócitos ($17,1 \pm 4,5$; $11,4 \pm 3,9$; $20,4 \pm 5,8$ e $31,4 \pm 5,6$), número de oócitos viáveis por OPU ($12,1 \pm 3,9$; $8,0 \pm 2,7$; $16,8 \pm 5,0$ e $24,3 \pm 4,7$) e de embriões produzidos *in vitro* (3,2; 2,1; 3,9 e 5,5) foram diferentes entre as raças Gir, Holandesa, Girolando 1/4 Holstein \times 3/4 Gir e Girolando 1/2 Holstein-Gir, respectivamente (Pontes et al., 2010). A associação entre CFA e número de oócitos e embriões viáveis já é consolidada, entretanto, quando se avalia o efeito da CFA sobre a capacidade de prenhez em fêmeas bovinas, os resultados ainda são controversos.

O número e a percentagem de prenhez na raça Brahman foram superiores à raça Simental. Tendo em vista que a CFA em fêmeas *Bos indicus* é superior às *Bos taurus*, hipotetiza-se que esta seja a principal explicação para as maiores taxas de prenhez observadas em fêmeas zebuínas. Tais variáveis são diretamente correlacionadas e possuem impacto no número final de prenhezes (Cushman et al., 2009; Mossa et al., 2012; Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011). Pontes et al. (2011) mostraram que o número de prenhezes em fêmeas Nelore com elevado número de oócitos ($n=78$) foi superior àquelas com baixo número de oócitos ($5,62 \pm 0,54$ e $0,92 \pm 0,13$). Entretanto, outro estudo demonstrou que a taxa de prenhez na raça Nelore não foi diferente nas classes com alta, intermediária e baixa CFA (30,0; 33,8 e 34,6, respectivamente; Morotti et al., 2015). A relação da CFA sobre a taxa de prenhez em fêmeas taurinas e mestiças são demonstradas em alguns estudos (Mossa et al., 2002; Pontes et al., 2010; Rocha e Lobato, 2002). Em fêmeas da raça Holandesa, a taxa de prenhez a campo em fêmeas com alta CFA foi maior do que nas com baixa CFA (94 e 84%). Além do mais, a taxa de prenhez a campo ao primeiro serviço na classe de CFA intermediária foi superior à baixa (45 e 32%; Mossa et al., 2012). Em fêmeas puras e mestiças, as taxas de prenhez (40%, 36%, 37% e 37%) foram diferentes ($P < 0,01$) entre as raças Gir, Holandesa, Girolando 1/2 Holstein-Gir e Girolando 1/4 Holstein \times 3/4 Gir, respectivamente (Pontes et al., 2010). As taxas de prenhez em novilhas cruzadas com sangue zebuínico (5/8

Hereford x 3/8 Nelore) foram menores quando comparadas com novilhas taurinas da raça Hereford (41,82% e 63,31%; Rocha e Lobato, 2002). Tais resultados contradizem a teoria de que fêmeas Zebuínas possuem maiores taxas de prenhez que as taurinas. Entretanto, deve-se levar em consideração que, em se tratando de novilhas, a precocidade sexual do genótipo taurino pode ter influenciado as maiores taxas de prenhez observadas na raça Hereford.

Os resultados do presente estudo indicaram que fêmeas com alta CFA possuem maior número de oócitos viáveis e embriões em comparação à classe com baixa CFA. Além disso, a eficiência de produção de embriões na classe intermediária foi superior às outras classes de CFA. Foi demonstrado que a produção de blastocistos pela OPU-PIVE depende do número de oócitos recuperados (Merton et al., 2003). O número médio de CCOs recuperados ($36,90 \pm 13,68$ vs. $5,80 \pm 3,40$) foi maior para fêmeas com alta CFA, resultando em maior número de embriões produzidos *in vitro* em fêmeas com alta vs. baixa CFA ($6,10 \pm 4,51$ vs. $0,55 \pm 0,83$). O número médio de embriões por coleta foi maior para classe com alta vs. baixa CFA ($6,95 \pm 5,34$ vs. $1,9 \pm 2,13$; Silva-Santos et al., 2014b). Evidencia-se que fêmeas com baixa CFA possuem menor quantidade de oócitos recuperados e embriões produzidos *in vitro* quando comparadas com fêmeas com alta CFA (Silva-Santos et al., 2013, 2014b). Em geral, a variação entre os animais nas classes de CFA foi correlacionada positivamente ($r = 0,80-0,90$) com o total de folículos (saudáveis e atresícos) e oócitos morfológicamente saudáveis nos ovários (Ireland et al., 2008). Ireland et al. (2007) demonstrou o número de oócitos e embriões recuperados ($10,6 \pm 2,7$ vs. $4,7 \pm 0,7$), número de embriões transferíveis ($5,4 \pm 1,3$ vs. $3,8 \pm 0,8$) e número de embriões produzidos *in vitro* ($4,9$ vs. $1,3$ embriões) foi maior ($P < 0,05$) para animais com alta comparada com baixa CFA. Após avaliação dos diversos relatos citados na literatura sobre a associação entre a CFA e a quantidade de oócitos e embriões, pode-se concluir que essa mensuração é uma ferramenta útil para prever a reserva ovariana bovina (Ireland et al., 2007, 2008, 2009, 2011). O

número de oócitos viáveis recuperados durante o processo de aspiração folicular e a PIVE podem ser preditos pela prévia contagem dos folículos antrais, assim, é possível selecionar previamente fêmeas que apresentaram maior CFA com objetivo de melhorar o desempenho na OPU (Ireland et al., 2007). Entretanto, quando se avalia a associação entre a CFA e a prenhez, os resultados ainda são contraditórios.

A porcentagem de prenhez e a eficiência dos oócitos viáveis em relação à quantidade de prenhez na classe de baixa CFA foram superiores as demais classes de CFA em fêmeas Brahman e Simental. Corroborando com esses resultados, Santos et al. (2013) mostraram que a taxa de prenhez em vacas da raça Nelore submetidas a PIVE foi maior em fêmeas com baixa CFA comparada com as de classe intermediária (60,50% vs. 48%), enquanto as vacas de CFA alta (51,67%) foi semelhante a ambas. No entanto, Alvarez et al. (2000) observaram resultados contrários, onde a baixa CFA foi associada com redução da taxa de prenhez a campo em novilhas devido à baixa competência de produção de embriões. Resultados similares relacionados à fertilidade também foram encontrados por Cushman et al. (2009) em que novilhas mestiças com alta CFA (>28) possuíram maior taxa de prenhez a campo que as de baixa CFA ($94,3 \pm 2,3$ vs. $85,5 \pm 3,4$). A taxa de prenhez total a campo em fêmeas da raça holandesa foi maior em fêmeas com alta CFA comparada com baixa (94 e 84%), não havendo diferenças dessas classes com a intermediária (88%; Mossa et al., 2012). Contrariamente aos autores citados acima, Rodrigues et al. (2013) não observaram diferenças nas taxas de concepção de fêmeas da raça Nelore submetidas à protocolo de Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) de acordo com a CFA. Em fêmeas Tabapuã, a maior contagem folicular antral foi correlacionada ($r = -0,12$) com menores intervalos de partos (Maculan, 2015, dados não publicados; Oliveira et al., 2002). Diante desses resultados contraditórios, evidencia-se a necessidade da realização de mais estudos que avaliem o efeito da população folicular ovariana (CFA) sobre a fertilidade das fêmeas quando

submetidas a biotecnologias reprodutivas (protocolos de IATF, PIVE, TE) e/ou na reprodução à campo (monta natural).

O efeito positivo da classe de LV sobre a PIVE é reportado pela primeira vez no presente estudo. Resultados semelhantes mostraram a relação da classe de LV com o número de CCOs em fêmeas da raça Tabapuã. O número de CCOs não foi diferente entre as classes de LV (grande: $9,90 \pm 1,40$; média: $13,09 \pm 0,98$ e pequena: $12,41 \pm 1,02$; Mesquita et al., 2016). Maculan et al. (2015), dados não publicados mostraram que a largura vulvar foi uma medida que indicou superioridade reprodutiva. Além de identificar que à medida que a largura vulvar aumentava, o intervalo de partos ($r = -0,15$) diminuía e a eficiência reprodutiva aumentava ($r = 0,17$). Sendo assim, a proposta da utilização dessa característica (largura vulvar) deve ser considerada em modelos que pretendem ser aplicados na seleção para a fertilidade.

Houve interação entre raça (Brahman e Simental) e as classes de contagem folicular antral (alta, intermediária e baixa) no presente estudo sobre as características reprodutivas. A produção de oócitos variou amplamente entre fêmeas da raça Nelore e foram designados como elevado, alto, intermediário e baixo, com $58,94 \pm 2,04$, $32,61 \pm 0,50$, $22,13 \pm 0,50$ e $10,26 \pm 0,57$; Pontes et al., 2011). O número de oócitos viáveis foi de $47,06 \pm 1,6$; $24,95 \pm 0,33$; $15,57 \pm 0,26$ e $6,31 \pm 0,38$; Pontes et al., 2011). Já foi demonstrado que a categoria animal e a quantidade de dias pós-parto não interferem na CFA (Rodrigues et al., 2015).

Considerando a importância da PIVE para o melhoramento genético em bovinos (Gonçalves et al., 2007), observa-se que existe grande diferença no número de embriões produzidos pela doadora, tanto em métodos *in vitro* como *in vivo* (Pontes et al., 2009, 2010, 2011). A CFA influencia resultados de PIVE em bovinos, com taxas mais elevadas para animais com alta CFA (Ireland et al., 2007; Santos et al., 2016; Silva-Santos et al., 2014b). Para os animais cruzados (5/8 Hereford x 3/8 Nelore), o número médio de embriões por coleta foi maior

em fêmeas com alta comparadas com baixa CFA ($6,9 \pm 5,3$ vs. $1,9 \pm 2,1$). Portanto, este estudo reforça o conceito evidente de que há benefícios quantitativos da produção de embriões de acordo com o número de folículos antrais (Silva-Santos et al., 2014b). Resultados semelhantes foram obtidos por Ireland et al. (2007) com doadoras *taurus*. Fêmeas com baixa CFA possuem menor número médio de embriões produzidos *in vitro* que animais com alta CFA (1,3 vs. 4,9 embriões). Há um consenso de que as vantagens quantitativas da doadora com CFA alta devem ser exploradas. Assim, as diferenças no número de folículos por doadora é um aspecto importante para programas comerciais de produção de embriões. Portanto, esse método de seleção é aconselhável na pré-avaliação de matrizes que serão utilizadas na reprodução a campo ou nas biotecnologias reprodutivas (IA, TE, PIVE).

A importância da CFA e sua relação com as taxas de prenhez também devem ser enfatizadas. Estudos realizados com fêmeas *taurus* mostraram maiores taxas de prenhez em fêmeas com altas CFA comparadas com a classe baixa (Cushman et al., 2009; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). A CFA baixa em fêmeas da raça Holandesa foi associada a várias características relacionadas à infertilidade, como ovários menores (Ireland et al., 2008), menos chances de prenhez no final da estação de reprodução (Mossa et al., 2012), redução da capacidade de resposta ao tratamento de superovulação, menos embriões viáveis (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007), menores concentrações circulantes de progesterona e AMH (Ireland et al., 2011; Evans et al., 2012) com reduzida espessura do endométrio (Jimenez-Krassel et al., 2009). Neste contexto, os animais com CFA alta foram provados superiores em todas as características mencionadas. Assim, é assumido e fundamentado que nas vacas existem associações entre CFA alta e indicadores de eficiência reprodutiva. Surpreendentemente, em *Bos indicus*, alguns dados sugerem melhor desempenho em relação às taxas de prenhez para vacas PIVE com baixa CFA (Santos et al., 2013). A taxa de prenhez em vacas da raça Nelore foi maior

em fêmeas com baixa CFA quando comparada com às de intermediária (60,50% vs. 48%), enquanto as vacas de CFA alta (51,67%) foi semelhante à ambas; Santos et al., 2013). No entanto, estudo recente com vacas Nelore mostrou que não houve diferença significativa na taxa de concepção em PIVE entre vacas com baixa, intermediária e alta CFA (58,6; 48,6 e 51,9%, respectivamente, Santos et al., 2016). No presente estudo, a maior CFA está relacionada com redução na taxa de prenhez, porém não suplanta a hipótese que maior CFA possui efeitos positivos sobre todas as características avaliadas. Sabe-se que fêmeas da classe de CFA alta possuem maior número médio de embriões por doadora, já para a classe CFA baixa, é necessário o dobro da quantidade de doadoras para conseguir atingir o número de prenhez semelhante as da classe de alta CFA. Diante disso, menor quantidade de fêmeas da classe de alta CFA serão necessárias para obter um número de prenhez expressível.

Houve interação entre raça (Brahman e Simental) e as classes de largura vulvar (grande, média e pequena) no presente estudo. Poucos trabalhos anteriormente mencionados avaliaram efeitos da largura vulvar (Maculan, 2015, dados não publicados; Mesquita et al., 2016). Visto que esse indicador e seus efeitos sobre as características reprodutivas ainda é um assunto recente. Pode-se afirmar que a largura da genitália externa relativa com o tamanho corporal é boa preditora de reserva folicular fêmeas bovinas (Mesquita et al., 2016). Nesse estudo, a CFA foi maior em fêmeas com maior largura vulvar comparada a baixa CFA ($20,08 \pm 1,36$ vs. $11,16 \pm 1,60$). Outro estudo demonstrou que fêmeas com CFA alta (>50 folículos) possuíram maior largura vulvar ($8,81 \pm 0,12$ cm) quando comparadas com fêmeas das classes intermediária ($8,42 \pm 0,11$ cm) e baixa ($8,38 \pm 0,13$ cm; Maculan, 2015, dados não publicados). Porém, não houve efeito da largura vulvar sobre a contagem de CCOs total (baixa: $12,41 \pm 1,02$; média: $13,09 \pm 0,98$ e grande: $9,90 \pm 1,40$, respectivamente; Mesquita et al., 2016).

Em outro estudo, fêmeas de maior largura vulvar tiveram menor intervalo de parto ($r=-0,15$) e maior eficiência reprodutiva ($r=0,17$), entretanto, não houve correlação com idade ao primeiro parto (IPP, $r=0,78$; Maculan, 2015, dados não publicados). A proposta da utilização dessa característica fenotípica poderá ser considerada em modelos que pretendem ser aplicados na seleção para a fertilidade. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar as possíveis relações entre mensurações do trato reprodutivo externo e a fertilidade de fêmeas bovinas. Ainda não existem relatos sobre a herdabilidade das características relacionadas à morfometria da genitália externa.

Embriões de fêmeas com alta CFA possuíram mais blastômeros que as demais classes. Achados mostraram que ovários com baixa CFA (menos que 10 folículos de 2 a 5 mm de diâmetro ou sem folículos) possuem CCOs com menor eficiência de produção de embriões *in vitro* e blastocistos com o menor número de células (Boni, 2012). Além disso, embriões viáveis possuem características como células simétricas, homogeneidade embrionária, baixa fragmentação, menos células apoptóticas, distribuição de linhagem celular apropriada com a proporção de massa de células/trofoderma (Houghton et al., 2002). Pode-se sugerir que um embrião bovino de boa qualidade tenha geralmente clivagem antecipada, se desenvolve com maior velocidade e contém células com morfologia normal. A contagem da clivagem em zigoto é utilizada como marcador de qualidade do embrião demonstrando incidência significativamente menor de alterações morfológicas em embriões em estágios iniciais (Pers-Kamczyc et al., 2012). No presente estudo, embriões de fêmeas da classe de CFA alta possuem maior número de blastômeros aliada a maior eficiência em relação a utilização de doadoras, o que justifica esse tipo de seleção para fêmeas provenientes dessa classe de CFA.

A tecnologia de reprodução assistida está intimamente relacionada com a compreensão das diferenças na fertilidade em fêmeas bovinas. Tentativas foram realizadas por vários

pesquisadores a fim de determinar indicadores de fertilidade (contagem folicular antral e morfometria da genitália externa) que poderiam prever um resultado bem-sucedido na PIVE. Isso seria benéfico na otimização da utilização de fêmeas com alto valor zootécnico e, assim, minimizar as perdas com animais de baixa fertilidade. Por meio deste estudo, esses indicadores foram identificados e os papéis desses marcadores na predição da resposta oocitária, embrionária e na taxa de prenhez foram demonstrados.

Conclusões

Houve uma relação clara entre CFA e LV em fêmeas das raças Brahman e Simental. A largura vulvar foi associada à classificação de CFA, de modo que, maiores larguras vulvares indicaram maiores CFA e maior produção *in vitro* de embriões. Assim, a proposta de utilização desses fenótipos deve ser considerada em modelos destinados à seleção de fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* para produção *in vitro* de embriões. Se faz necessário mais estudos envolvendo as características CFA e LV no número de prenhez em fêmeas zebuínas e taurinas.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada e financiada pela Fazenda Casa Branca Agropastoril, Careaçú-MG em parceria com a Universidade Federal do Ceará – UFC, Sobral-CE. Não houve conflito de interesses que pudesse ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Referências

Alvarez, P., Spicer, L.J., Chase, C.C. Jr., Payton, M.E., Hamilton, T.D., Stewart, R.E., Hammond, A.C., Olson, T.A., Wettemann, R.P., 2000. Ovarian and endocrine characteristics

- during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.* 78 (5), 1291-1302.
- Baruselli, P.S., Sá Filho, M.F., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Gimenes, L.U., Vieira, L.M., Mendanha, M.F., Bó, G.A., 2012. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 134–141.
- Boni, R., 2012. Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Anim. Reprod.* 9 (3), 333-340.
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F.J., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62.
- Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifer. *Theriogenology.* 69, 167–175.
- Chacur, M.G.M., Valentim, N.C, Martinez, A.I.S., Tostes, R.A., Kronka, S.N., 2006. Morphometry of ovaries of female zebu *Bos taurus indicus* collected in slaughterhouse *Acta. Sci. Vet.* 34 (1), 65-70.
- Costa, E.P., Lopes, F.G., Pereira, E.C.M., Queiroz, V.L.D., Macedo, G.G., Almeida Neto, J.R.M., Costa, A.H.A., 2010. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62 (6), 1507-1510.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C.; 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980.

- Cushman, R.A., De Souza, J.C., Hedgpeth, V.S, Britt, J.H., 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60, 349–354.
- Evans, A.C., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L., Smith, G.W., Ireland, J.J., 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31-37.
- Gonçalves, P.B.D., Barreta, M.H., Sandri, L.R., Ferreira, R., Antoniazzi, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. 2007. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31 (2), 212-217.
- Govignon, A., Rohou, A., Ponsart, C., Delcroix, P., Humblot, P., 2000. Sources of variation of embryo production after superovulation in Prim Holstein dairy cows. In 16eme Reunion de la AETE, 158.
- Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., Hogg, J.E., Balen, A.H., Rutherford, A.J., Leese, H.J., 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod.* 17(4), 999-1005.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human. Reprod.* 22 (6), 1687–1695.
- Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225.

- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2011. 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-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Develop.* 23, 1–14.
- Ireland, J.J., Zielak-Steciwo, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C., 2009: Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 954–964.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C., Ireland, J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy Young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272-1281.
- Lowman, B.G.N., Scott, N.A., Somerville, S.H. Condition scoring of cattle. Edinburgh: The Edinburgh School of Agriculture 1976: 5p. (East of Scotland College of Agriculture. Bulletin, 6).
- Maculan, R. Características indicadoras de fertilidade em fêmeas da raça Tabapuã. 2015. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- Martins Jr, A., Takada, L., Abrahão, R.G., Freitas, C.P., Calegari, R.S., 2007. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. *Acta. Sci. Veterin.* 35, 1194-1194 (Resumo).

- McMillan, W.H., Donnison, M.J., 1999. Understanding maternal contributions to fertility in recipient cattle: development of herds with contrasting pregnancy rates. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 127–140.
- Merton, J.S., de Roos, A.P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L., Dieleman, S.J., 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59, 651–674.
- Mesquita, N.F., Maculan, R., Maciel, L.F.S., Alves, N., De Carvalho, R.R., Moreira, G.M, De Souza, J.C., 2016. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. *J. Reprod. Develop.* 62 (6), 587-590.
- Modina, S.C., Tessaro, I., Lodde, V., Franciosi, F., Corbani, D., Luciano, A.M. 2013. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 235-244.
- Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.Z., Gonzalez, S.M., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M., 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? *Anim. Reprod.* 12, 479–486.
- Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 95 (5), 2355-2361.
- Park, Y.S., Kim, S.S., Kim, J.M., Park, H.D., Byun, M.D., 2005. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*. 64, 123-134.
- Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., Rubes, J., Lechniak, D., 2012. Early cleaved bovine embryos show reduced incidence of chromosomal aberrations and higher developmental potential on day 4.5 post-insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 899-906.

- Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*. 71, 690-697.
- Pontes, J.H.F., Melo-Sterza, F.A, Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C.P., Seneda, M.M., 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 75, 1640-1646.
- Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G., Sanches, B.V., Porcinato, J.P.F., Vieira, P.H.S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L., Seneda, M.M., 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 74, 1349-1355.
- Rocha, M.G., Lobato, J.F.P., 2002. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. *Rev. Bras. Zoot.* 31 (3), 1388-1395.
- Rodrigues, A.S., Oliveira, S.N., Loiola, M.V.G., Andrade, B.H.A., Ferraz, P.A., Ayres, M.C.C., Bittencourt, R.F., Chalhoub, M., Filho, A.L.R., 2013. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. *Pesq. Agrop. Bras.* 48 (7), 801-804.
- Rodrigues, A.S., Oliveira, S.N., Loiola, M.V.G., Ferraz, P.A., Chalhoub, M., Bittencourt, R.F., Araujo, E.A.B., Bittencourt, T.C.B.S.C., Filho, A.L.R., 2015. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Ciência Rural*. 45 (4), 711-717.

- Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Blaschi, W., Morotti, F., Silva, C.B., Moraes, F.L.Z., Giudicissi, D.P.L., Seneda, M.M., 2013. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim. Reprod.* 10, 451. (abstract).
- Santos, G.M.G.D., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches, B.V, de Moraes, F.L.Z., Blaschi, W., Seneda, M.M., 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 165, 17-21.
- Satwik, R., Kochhar, M., Gupta, S.M., Majumdar, A., 2012. Anti-Mullerian hormone cutoff values for predicting poor ovarian response to exogenous ovarian stimulation in *in vitro* fertilization. *J. Hum. Reprod. Sci.* 5, 206–212.
- Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Santos, G.M.G., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M., 2014a. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 48–51.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M., Koetz Júnior, C., Morotti, F., Siloto, L.S., Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C, Seneda, M.M., 2014b. Antral follicle populations and embryo production *in vitro* and *in vivo* of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 228-32.
- Silva-Santos, K.C., Marinho, L.S.R., Santos, G.M.G., Machado, F.Z., Gonzalez, S.M., Lisboa, L.A., Seneda, M.M., 2013. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim. Reprod.* 10 (3), 180-186.
- Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology.* 62, 227-243.

- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C., 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 65, 126-136.
- Thermo Fisher Scientific (EUA) (Org.). Hoechst 33342: Instructions. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/instructions/2162245.pdf>>. Acesso em: 29 de maio de 2012.
- Thibier, M., 2004. 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: a report from the IETS data retrieval committee. *Internat. Embryo Transfer. Society Newsletter*, 12-19.
- Viana, J.H.M., Ferreira, A.M., Sá, W.F., Carmargo, L.S.A., 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq. Agrop. Bras.* 25, 2501-2509.
- Watanabe, M.R., Watanabe, Y.F., Franceschini, P.H., Dayan, A., Lobo, R.B. 1999. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 51, 438.