

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NA  
SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA PRÉVIA A OPU EM VACAS  
BRAFOR: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E NA  
CINÉTICA DE FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BIBIANA NOAL RIBAS**

Uruguaiana

2017

**BIBIANA NOAL RIBAS**

**GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NA  
SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA PRÉVIA A OPU EM VACAS  
BRAFORD: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E NA  
CINÉTICA DE FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Fabio Gallas Leivas

Co-orientadora: Dra. Daniela dos Santos Brum

**Uruguaiana**

**2017**

**BIBIANA NOAL RIBAS**

**GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NA  
SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA PRÉVIA A OPU EM VACAS  
BRAFORDE: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E NA  
CINÉTICA DE FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal

Dissertação defendida e aprovada em 08 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas  
Orientador  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Gilson Antônio Pessoa  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Dedico essa conquista aos meus pais, Denise e Emidio, por tudo que já fizeram e o quanto são especiais para mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pelo apoio, incentivo e por nunca medirem esforços para que eu pudesse continuar estudando.

Ao meu irmão Ramiro, por ser um grande amigo e a quem confio muito.

Ao meu noivo Leonardo, pelo carinho, compreensão, apoio e paciência.

Aos meus avós, Moacir (*In memoriam*) e Elsa, por serem os grandes incentivadores do gosto pela vida do campo.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, BIOTECH, que colaboraram direta e indiretamente na execução deste trabalho.

Aos professores Fábio Leivas e Daniela Brum, por me receberem ao BIOTECH. Pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Por todos os ensinamentos não apenas teóricos, mas também lições para a vida.

Ao meu orientador Dr. Fábio Leivas, pela orientação, confiança e paciência durante esse período.

Aos colegas e professores do PPGCA, que sem dúvida são parte importante desta conquista.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Universidade Federal do Pampa

### **GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NA SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA PRÉVIA A OPU EM VACAS BRAFORD: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E NA CINÉTICA DE FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

AUTOR: Bibiana Noal Ribas  
ORIENTADOR: Dr. Fabio Gallas Leivas  
Uruguaiana-RS, 8 de dezembro de 2017.

Devido à grande necessidade em aumentar o material genético nos bovinos, as técnicas OPU/PIV vêm sendo aplicadas em larga escala com a finalidade de se obter um maior número de produtos nascidos por ano de fêmeas selecionadas. No entanto, alguns animais apresentam um baixo número de folículos disponíveis para a OPU, enquanto outros apresentam uma baixa taxa de conversão de oócitos em embriões. Neste contexto trabalhos que busquem maximizar os resultados de OPU/PIV são essenciais. Uma das alternativas é manipular farmacologicamente o desenvolvimento folicular para obter oócitos mais competentes para a fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em um protocolo prévio à OPU, sobre o desenvolvimento folicular, número e qualidade dos oócitos recuperados assim como potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Dezesesseis vacas doadoras Braford foram submetidas a 4 sessões de OPU com intervalo de 15 dias entre cada aspiração (n=16 por tratamento; cross over), para avaliar o efeito da dose de eCG as doadoras foram divididas de acordo com os respectivos tratamentos (Controle = zero, eCG200 = 200UI de eCG, eCG400 = 400UI de eCG e eCG800 = 800UI de eCG). No início do protocolo de sincronização (D0), as doadoras receberam 2 mg de benzoato de estradiol IM, 12,5 mg de dinoprost trometamina IM e um dispositivo de liberação lenta de P4 intravaginal. No dia 3, as doadoras receberam uma dose de eCG de acordo com cada tratamento e no dia 6, o dispositivo de P4 foi removido e as doadoras submetidas a OPU. Antes da OPU, os

folículos ovarianos foram visualizados, mensurados e classificados de acordo com o diâmetro em pequenos (<6mm), médios (6-10mm) e grandes (>10mm). Após a OPU, os oócitos viáveis de cada vaca foram levados a MIV e FIV em grupos de acordo com os tratamentos. A MIV foi realizada durante 24h à 39°C em TCM 199 modificado. Para a fecundação *in vitro*, os espermatozoides de um touro *Bos taurus* de fertilidade comprovada foram selecionados por gradientes de Percoll e co-incubados com os oócitos por 18h. Após a FIV, 50% dos prováveis zigotos foram avaliados quanto à taxa de fecundação por epifluorescência. O restante dos oócitos foram transferidos para gotas de SOFaaci e cultivados *in vitro* para avaliação da taxa de clivagem, momento da primeira clivagem e número de células às 48 horas em um sistema de monitoramento embrionário. As análises estatísticas foram realizadas com ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença no número de folículos, quantidade e qualidade morfológica dos oócitos obtidos entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). A taxa de recuperação de oócitos foi semelhante entre os grupos tratados com eCG, porém, inferior ao grupo Controle ( $p < 0,0001$ ). No entanto, o grupo eCG800 apresentou maior número de folículos médios e grandes (>6mm e >10mm;  $P < 0,00001$ ). Adicionalmente o grupo eCG800 apresentou maior taxa de fecundação normal ( $54,3 \pm 8,5$ ) e menor taxa de polispermia ( $5,7 \pm 4,0$ ) que os demais grupos ( $P < 0,05$ ). Os grupos eCG800 e Controle tiveram maior taxa de clivagem que os demais tratamentos,  $68,6 \pm 7,9$  e  $75,6 \pm 6,8$ , respectivamente. Não houve diferença no momento da primeira clivagem e no número médio de células às 48 h entre os tratamentos. Com base nestes dados, pode-se concluir que a dose de 800UI de eCG aumentou a proporção de folículos >6mm, proporcionando a maior taxa de fecundação normal e uma redução na taxa de polispermia em relação ao Controle e as demais doses de eCG, sem prejuízos a cinética de desenvolvimento embrionário até 48 horas.

**Palavras Chave:** Bovino, superestimulação, eCG, OPU/PIV.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Animal Science  
Federal University of Pampa

### **DOSES OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) IN OVARIAN SUPERTIMULATION PRIOR TO OPU IN BRAFORD COWS: EFFECT ON FOLLICULAR GROWTH AND FERTILIZATION POTENTIAL AND EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO***

AUTHOR: Bibiana Noal Ribas

ADVISOR: Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiiana, December 8<sup>th</sup>, 2017.

Due to the great need to increase the genetic material in cattle, the OPU / PIV techniques have been applied in a large scale in order to obtain a larger number of products born per year of selected females. However, some animals have a low number of follicles available for OPU, while others have a low rate of oocyte conversion in embryos. In this context, works that seek to maximize OPU / PIV results are essential. One of the alternatives is to pharmacologically manipulate follicular development to obtain more competent oocytes for *in vitro* fertilization and embryonic development. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different doses of equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) on a protocol prior to OPU, on the follicular development, number and quality of oocytes recovered as well as potential for fertilization and *in vitro* embryo development. Sixteen Braford donor cows were submitted to 4 OPU sessions with a 15 day interval between each aspiration (n = 16 per treatment, cross over), to evaluate the effect of the eCG dose the donors were divided according to the respective treatments (Control = zero, eCG200 = 200UI of eCG, eCG400 = 400UI of eCG, and eCG800 = 800UI of eCG). At the beginning of the synchronization protocol (D0), the donors received 2 mg of estradiol IM benzoate, 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM and a slow intravaginal P4 release device. On day 3, the donors were given a dose of eCG according to each treatment and on day 6, the P4 device was removed and the donors were subjected to OPU. Before OPU, ovarian follicles were visualized, measured and classified according to the diameter in small (< 6 mm), medium (6-10 mm) and large (> 10 mm). After OPU, viable



oocytes from each cow were taken to IVM and IVF in groups according to treatments. IVM was performed for 24 hours at 39°C in modified TCM 199. For *in vitro* fertilization, the sperm of a *Bos taurus* bull of proven fertility were selected by Percoll gradients and co-incubated with the oocytes for 18 h. After IVF, 50% of probable zygotes were evaluated for fertilization rate by epifluorescence. The remaining oocytes were transferred to drops of SOFaaci and cultured *in vitro* for evaluation of the cleavage rate, time of the first cleavage and cell number at 48 hours in an embryonic monitoring system. Statistical analyzes were performed using ANOVA and the means were compared by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). There was no difference in the number of follicles, quantity and morphological quality of the oocytes obtained between the treatments ( $P < 0.05$ ). The oocyte recovery rate was similar between the eCG treated groups, but lower than the Control ( $p < 0.001$ ). However, the eCG800 had a greater number of medium and large follicles ( $> 6$  mm and  $> 10$  mm,  $P < 0.00001$ ). In addition, the eCG800 had a higher normal fertilization rate ( $54.3 \pm 8.5$ ) and a lower rate of polyspermy ( $5.7 \pm 4.0$ ) than the other groups ( $P < 0.05$ ). The eCG800 and Control had a higher cleavage rate than the other treatments ( $68.6 \pm 7.9$  and  $75.6 \pm 6.8$ ), respectively. There was no difference at the time of the first cleavage and in the average number of cells at 48 h between treatments. Based on these data, it can be concluded that the dose of 800UI of eCG increased the proportion of follicles  $> 6$ mm, providing the highest rate of normal fertilization and a reduction in the rate of polyspermia in relation to Control and the other doses of eCG, without impairing the kinetics of embryonic development until at 48 hours.

**Keywords:** Bovine, stimulation, eCG, OPU/PIV.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figure 1:</b> Experimental design and treatment protocols.....	36
<b>Figure 2:</b> Proportion of small (<6 mm), medium (6 - 10 mm) and large (>10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Braford cows treated with different eCG treatments (Control, eCG200, eCG400, and eCG800).....	41
<b>Figure 3:</b> Evaluation of total fertilization rate, normal fertilization and polyspermy of oocytes obtained from Braford cows overestimated with different eCG dose (Control, eCG200, eCG400, and eCG800).....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1:</b> Results (mean $\pm$ SEM) of ovum pick-up (OPU) in Braford cows superestimulated with different eCG dose (Control, eCG200, eCG400, and eCG800)..	42
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH – Hormônio antimulleriano  
ANOVA – Análise de variância  
bFGF – Fator de crescimento fibroblástico básico  
BMP-15 – Proteína morfogenética óssea 15  
BSA – Albumina sérica bovina  
CCO – Complexo *cumulus* oócito  
CIV – Cultivo *in vitro*  
CL – Corpo lúteo  
COCs – Cumulus oocyte complexes  
E2 – Estradiol  
eCG – Equine Gonadotrophin Chorionic  
FBS – fetal bovine sérum  
FD – Folículo dominante  
FIV – Fecundação *in vitro*  
FSH – Hormônio folículoestimulante  
GDF-9 – Fator de crescimento e diferenciação 9  
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina  
IATF – Inseminação artificial em tempo fixo  
IVC – *In vitro* culture  
IVF – *In vitro* fertilization  
IVM – *In vitro* maturation  
IVP – *In vitro* production  
KL – Fator *kit ligand*  
LH – Hormônio luteinizante  
MIV – Maturação *in vitro*  
mRNA – RNA mensageiro  
NGF – Fator de crescimento do nervo

OPU – *Ovum pick-up*

P4 – Progesterona

PBS – Solução Salina Fosfatada

p-FSH – Follicle stimulating hormone from porcine pituitary

PGF – Prostaglandinas F2

PHE – Penicilamina, hipotaurine e epinefrina

PIV – Produção *in vitro* de embriões

SOFaaci – Fluido sintético de oviduto

Talp-Fert - Solução de Tyrode's, acrescida de albumina, lactato e piruvato

TCM 119 – Meio de cultivo celular 199

TE – Transferência embrionária

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xii
1- INTRODUÇÃO .....	16
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Foliculogênese .....	18
2.2 Fisiologia do ciclo estral .....	20
2.3 Regulação endócrina do ciclo estral .....	21
2.4 Manipulação do ciclo estral em doadoras de oócitos.....	23
2.5 Fatores que influenciam a eficiência dos programas OPU/PIV.....	25
3- OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
4- ARTIGO CIENTÍFICO.....	30
Abstract.....	32
1. Introduction .....	33
2. Materials and methods .....	34
2.1 Experimental location and animals .....	34
2.2 Experimental design and treatment protocols .....	35
2.3 Follicular diameter, OPU and oocyte classification.....	36
2.4 <i>In vitro</i> embryo production (IVP) .....	37
2.5 Statistical analyses.....	39
3. Results.....	40
3.1 Follicles at the time of OPU .....	40
3.2 Aspirated follicles at the time of OPU and recovered COC .....	40
3.3 Evaluation of the fertilization and kinetics of embryonic development .....	40
4. Discussion.....	43
5. Conclusion .....	45
Acknowledgments .....	46
References.....	46

5- CONCLUSÕES.....	52
6- PERSPECTIVAS .....	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## 1- INTRODUÇÃO

A grande necessidade em aumentar o material genético nos bovinos, tanto de corte quanto de leite, vem contribuindo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas. A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos junto com a técnica de obtenção de oócitos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia, conhecida como OPU (*ovum pick-up*), são biotecnologias que vem sendo aplicadas em larga escala com o objetivo de se obter um maior número de produtos nascidos por ano de fêmeas selecionadas. Além de acelerar o melhoramento genético de um rebanho, a OPU/PIV é uma importante ferramenta de pesquisa para embriologia animal.

No ano de 2015, a nível mundial, foram produzidos 671.111 embriões PIV, sendo 612.709 embriões produzidos com oócitos obtidos por OPU e 58.402 embriões produzidos com oócitos derivados do abatedouro, superando pela primeira vez o número de embriões produzidos *in vivo*. Destes, 269.353 embriões bovinos oriundos de OPU/PIV foram transferidos no Brasil, que hoje ocupa o espaço de maior produtor de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Perry, 2016). Isso se deve pela vasta produção e valorização do gado *Bos indicus*, e também pelos aspectos fisiológicos da raça (Viana e Camargo, 2007). Animais da raça Nelore normalmente recrutam um maior número de folículos por onda de crescimento folicular em comparação com vacas *Bos taurus* (Pontes *et al.*, 2011) resultando em uma maior produção de embriões, fato que tornou a técnica viável economicamente.

O processo OPU/PIV compreende a coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência embrionária (TE). Estes processos encontram-se em constante evolução, devido a diversos estudos que vêm sendo realizados com o objetivo de incrementar as etapas dessas biotécnicas, visando sua máxima eficiência. Na OPU, os fatores que podem influenciar os resultados incluem a genética da doadora (Pontes *et al.*, 2011), o tamanho do folículo (Lonergan *et al.*, 1994; Seneda *et al.*, 2001), a fase folicular (Machatkova *et al.*, 2004) e a qualidade do oócito (Chaubal *et al.*, 2006). Por isso, os protocolos prévios a aspiração podem ser um incremento para melhorar a eficiência dessa técnica, onde estes foram desenvolvidos com o objetivo de controlar a onda de crescimento folicular, superestimular o crescimento desses folículos e ainda, alguns favorecer a maturação dos oócitos (Goodhand *et al.*, 2000; Chaubal *et al.*, 2007; Sendag *et al.*, 2008).



A superestimulação ovariana com gonadotrofinas (p-FSH e eCG) em protocolos prévios a OPU, têm se mostrado favorável, com aumento expressivo no número de folículos disponíveis para a aspiração, com maior número de oócitos recuperados e de embriões produzidos (Sauvé, 1998; Blondin *et al.*, 2002; Goodhand *et al.*, 2000). Estes protocolos são indicados em animais senis, com aderências ovarianas ou com pequena produção de oócitos, como em vacas *Bos taurus*, que geralmente possuem menor quantidade de folículos disponíveis (Merton *et al.*, 2003), permitindo assim, que um grupo de folículos cresça de forma homogênea e que um maior número de oócitos seja obtido a partir dessas doadoras (Chaubal *et al.*, 2006; Sendag *et al.*, 2008). Além disso, a superestimulação promove o crescimento dos folículos, que parece ser importante para determinar a qualidade dos oócitos (Sirard *et al.*, 1999). Segundo Lonergan *et al.* (1994) e Castilho *et al.* (2007), oócitos provenientes de folículos >6mm de diâmetro se desenvolvem melhor quando fecundados *in vitro*. Isso se deve às mudanças nos *complexos cumulus-oócitos* (CCOs), que se assemelham a uma pequena ou muito discreta atresia, porém, seus oócitos preservam uma boa competência de desenvolvimento (Vassena *et al.*, 2003).

As gonadotrofinas utilizadas nos protocolos prévios a OPU são a p-FSH e eCG, porém, quando comparadas, a p-FSH apresenta melhores resultados (De Roover *et al.*, 2005; Sendag *et al.*, 2008; Ongaratto *et al.*, 2015). Contudo, além de possuir um custo bastante elevado, pela sua meia vida curta, a p-FSH requer a necessidade de múltiplas aplicações, o que pode limitar sua aplicabilidade. Já a eCG, é um fármaco mais econômico e que requer uma única aplicação devido sua meia vida longa (até 3 dias). É produzido nos cálices endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias), sendo uma variante do hormônio luteinizante equino (LH), diferencialmente glicosilada pelas células do trofoblasto equino (Murphy, 2012). Essa gonadotrofina se liga tanto aos receptores de FSH quanto aos de LH nos folículos, e isso faz com que estimule a esteroidogênese e o crescimento folicular (Duffy *et al.*, 2004). Quanto a sua aplicação em protocolos de superestimulação prévia a OPU, há uma grande variação quanto a dose de eCG a ser utilizada, com relatos de 400 até 3000UI, o que leva à uma grande variabilidade de resultados. Além disso, não há estudos comparando diferentes doses de eCG e seu efeito no crescimento folicular e potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Dessa forma, torna-se importante mais estudos com uso de eCG na superestimulação em protocolos prévios a OPU e seus efeitos sobre a qualidade oocitária. Por isso, o objetivo deste estudo foi comparar a resposta ovariana, a qualidade dos oócitos, bem como a taxa de fecundação e a cinética de desenvolvimento embrionário *in vitro* em vacas Braford superestimadas com diferentes doses de eCG antes da aspiração folicular.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Foliculogênese

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, tendo início com o surgimento de folículos primordiais até o estágio de folículos dominantes ou pré-ovulatórios. A foliculogênese tem início com a formação dos folículos durante a vida fetal, por isso, as fêmeas possuem uma reserva limitada de células germinativas (Forde *et al.*, 2011). Ao nascimento, as fêmeas bovinas possuem em seus ovários em torno de 150.000 folículos primordiais e aos 20 anos esse número reduz para 3.000 (Bao e Garverck, 1998). Apesar desse imenso número de folículos primordiais, apenas 1% dessa população atinge a fase pré-ovulatória durante a vida reprodutiva (Silva-Santos *et al.*, 2013), enquanto o restante sofre atresia (Adams *et al.*, 1992).

O processo de foliculogênese, nas fêmeas ruminantes, é um processo determinado pela interação das células somáticas da parede folicular com o oócito, sendo responsável pela comunicação entre folículos e comunicação endócrina (Forde *et al.*, 2011; Campos-Júnior *et al.*, 2009). Este processo pode ser dividido nas fases preantral e antral. Na fase preantral, ocorre a ativação dos folículos primordiais e posterior crescimento para os estágios de folículos primários e secundários. A fase antral tem início com o aparecimento do antro nos folículos terciários e termina com a formação do folículo pré-ovulatório (Ireland, 1987).

Os folículos primordiais compõem o estoque de folículos formados durante a fase fetal e que vão se desenvolver durante a vida reprodutiva da fêmea. Esses folículos, em estado quiescente, são caracterizados por um oócito na prófase da primeira divisão meiótica, sem zona pelúcida, rodeado por algumas células da pré-granulosa e envolvidas pela membrana basal (Gonçalves *et al.*, 2008). Nesses folículos, já ocorre a esteroidogênese, porém ela é independente das gonadotrofinas (LH, FSH). Nesse estágio, o oócito e as células da granulosa ainda não expressam receptores, e o controle da esteroidogênese se dá através de neurotransmissores (Campos-Júnior *et al.*, 2009).

A partir do momento em que o folículo primordial inicia seu crescimento, este processo continua ininterruptamente até a ovulação ou atresia (Hirsgifield, 1991; Soto-Suazo e Zorn, 2005; Gonçalves *et al.*, 2008). Esse mecanismo determinante da passagem do estágio de folículo primordial para folículo primário, no qual as células da granulosa crescem e se multiplicam, não está totalmente conhecido, porém estudos mostram que fatores como kit

ligand (KL), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), hormônio antimulleriano (AMH) e fator de crescimento do nervo (NGF) participam da regulação do reinício do desenvolvimento de folículos primordiais (Gonçalves *et al.*, 2008). Também há interação de diversos fatores de crescimento sendo estes responsáveis pelo recrutamento de folículos primordiais até a expressão de RNA mensageiro (mRNA) para receptor de hormônio folículo estimulante (FSH) e conseqüentemente dependência de gonadotrofinas para continuar o seu desenvolvimento (Gonçalves *et al.*, 2008).

Os folículos primários são caracterizados pela presença de uma única camada de células da granulosa de forma cúbica em torno do oócito, que permanece com o mesmo diâmetro (Fortune, 2003; Van Den Hurk e Zhao, 2005). Durante esse estágio, em bovinos, ocorre a formação da zona pelúcida (Fair *et al.*, 1997). Após a transição entre folículo primordial para primário, o oócito começa a aumentar seu diâmetro e ocorre um aumento da taxa de mitose das células da granulosa.

O folículo secundário recebe um aumento da vascularização, possibilitando a atuação de sinais endócrinos. Nesse estágio, o oócito, já se torna sensível às gonadotrofinas (FSH; Xu *et al.*, 1995; Bao e Garverick, 1998). As células da teca aumentam o número de receptores de LH, iniciando a síntese de andrógenos, convertidos em estrógenos pela enzima aromatase que, por sua vez, aumentam o número de receptores de FSH nas células da granulosa, amplificando a ação desta gonadotrofina (Seneda e Bordignon, 2007).

Com o aumento do metabolismo do oócito, há um acréscimo no número de junções intercomunicantes do tipo GAP entre os oócitos e as células da granulosa (Fair *et al.*, 1997), que atuam na comunicação bidirecional, na transferência de nutrientes, metabólitos (nucleotídeos e aminoácidos), fatores de estimulação e/ou inibição da meiose, além de fatores de crescimento, neurotropinas e hormônios (Fortune, 2003; Seneda e Bordignon, 2007). Fatores de crescimento, como o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9). O GDF-9 e a proteína morfogenética óssea (BMP 15) são expressos em oócitos a partir desse estágio e são essenciais para continuar o desenvolvimento a partir de folículo secundário (Gonçalves *et al.*, 2008).

A transição do folículo secundário para o estágio do folículo terciário é caracterizada pela contínua proliferação e diferenciação das células somáticas que cercam o oócito para formar a teca interna e teca externa, a lâmina basal, e ainda a formação de uma pequena cavidade antral, que é preenchida pelo líquido folicular, sendo importante em mecanismos de regulação e modulação de substâncias provenientes das células foliculares e da comunicação endócrina que o folículo começa a estabelecer (Fortune, 2003; Van Den Hurk e Zhao, 2005).

O crescimento terminal de folículos antrais é um processo altamente dependente de gonadotrofinas. A atividade esteroidogênica e produção de inibina pelos folículos aumenta drasticamente durante esta fase, resultando em uma importante modulação da secreção de gonadotrofinas pelo clássico efeito de feedback (Fortune, 1994). O FSH exerce um papel importante na expressão de receptores de FSH e LH bem como na diferenciação das células da granulosa (Rao *et al.*, 1978). Durante o desenvolvimento folicular nesta fase, uma importante etapa é a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa, pois o LH é progressivamente hábil para promover a maturação folicular.

Folículos pré-ovulatórios, representam estágio terminal do desenvolvimento folicular. Nesse estágio, o oócito se encontra com o maior diâmetro possível e cessa completamente a transcrição nuclear, atingindo a competência para concluir sua divisão meiótica e, em seguida, para ser fecundado e desenvolver-se em blastocisto (Seneda e Bordignon, 2007).

## 2.2 Fisiologia do ciclo estral

O ciclo estral bovino tem início na puberdade, que ocorre normalmente entre 6 e 12 meses de idade, geralmente quando a fêmea atinge 50% do peso adulto, e representa um padrão cíclico da atividade ovariana, onde as fêmeas entram em um período de receptividade sexual possibilitando o estabelecimento da gestação, após o acasalamento (Forde *et al.*, 2011).

As fêmeas bovinas são poliéstricas estacionais, onde apresentam estros regulares com intervalo a cada 21 dias, com variação de 18 a 24 dias (Hafez e Hafez, 2004). O crescimento dos folículos ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular (Ginther *et al.*, 1989, Adams *et al.*, 1992), podendo haver de 2 a 4 ondas por ciclo (Forde *et al.*, 2011). Cada onda de crescimento envolve emergência, seleção e domínio seguido de atresia ou ovulação (Gonçalves *et al.*, 2008).

O ciclo estral é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise ovário, pelos hormônios do hipotálamo (Hormônio liberador de gonadotrofina, GnRH), hipófise (Hormônio folículo estimulante, FSH e Hormônio luteinizante, LH), os ovários (progesterona, P4; estradiol, E2 e inibina) e o útero (prostaglandinas F2alfa, PGF), onde estes trabalham através de um sistema de Feedback positivo e negativo (Roche, 1996).

O ciclo está dividido em duas fases distintas: A fase folicular (4 – 6 dias) e a fase luteínica (14 – 18 dias). A fase folicular, ou também conhecida como período de

desenvolvimento folicular, está dividida em pró-estro (2 – 3 dias) e estro, e é o período que vai da luteólise do corpo lúteo (CL) até a ovulação, incluindo maturação final, ovulação do folículo ovulatório e liberação do oócito para o oviduto. Já a fase lútea, está dividida em metaestro e diestro, e é o período após a ovulação, quando o CL é formado (Forde *et al.*, 2011).

### 2.3 Regulação endócrina do ciclo estral

Os diferentes momentos do ciclo estral (fase folicular e luteal) são regulados pelo hormônio hipotalâmico, GnRH, que atua na hipófise anterior, regulando a liberação das gonadotrofinas, FSH e LH (Forde *et al.*, 2011).

A fase folicular é marcada por níveis basais de progesterona, devido à luteólise do corpo lúteo (CL). Durante um ciclo estral, ocorrem normalmente duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas, onde um *pool* de aproximadamente 8 a 41 folículos emerge do córtex do ovário e iniciam seu crescimento (Adams *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2008). Cada onda folicular é iniciada por um aumento da liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) da hipófise anterior (Ginther *et al.*, 2002). Aproximadamente dois dias após o recrutamento, um folículo é selecionado e se torna dominante e continua a crescer (Bao e Garverick, 1998). Estes folículos que estão em crescimento, dobram seu tamanho em aproximadamente quatro dias. Esse crescimento rápido em volume decorre da acumulação do líquido folicular. Esse aumento de tamanho permite que o folículo dominante (FD) aumente sua produção de estradiol (E2) e inibina, que são liberados para a corrente sanguínea e suprimem a liberação de FSH (Hiller, 1994; Gibbons *et al.*, 1994).

Os níveis de estradiol (E2) afetam a síntese e liberação de LH e FSH (Beg *et al.*, 2002; Hafez e Hafez, 2004). Maiores níveis de E2 são encontrados em ondas ovulatórias do que em ondas não ovulatórias e atingem níveis máximos em torno do estro (Hafez e Hafez, 2004). Isto sugere que o folículo pré-ovulatório tem uma maior capacidade para produzir e liberar E2. O E2 induz mudanças de comportamento associadas ao estro e induz a liberação de um pico pré-ovulatório de GnRH, seguido por um pico de liberação de LH que causa a ovulação do FD (Binelli *et al.*, 2006).

A inibina suprime o FSH, e dessa forma, faz com que tenha concentrações decrescentes de FSH, o que restringe o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entram em atresia (Sunderland *et al.*, 1994; Binelli *et al.*, 2006). Isso marca a

necessidade de FSH pelos folículos dependentes de gonadotrofinas, tornando-os mais suscetíveis a atresia (Ginther *et al.*, 2002). Por outro lado, o folículo dominante expressa mais receptores de FSH, e, portanto, pode continuar a crescer mesmo quando os níveis séricos de FSH são baixos (Beg *et al.*, 2002).

O FD selecionado continua seu crescimento de modo que os folículos dependentes de FSH sofram atresia, e ele, torna-se cada vez mais receptivo à LH (Ginther *et al.*, 2000), devido a presença de receptores de LH nas células da granulosa (Xu *et al.*, 1995; Gonçalves *et al.*, 2008). A taxa de crescimento do FD é maior quanto maior for a frequência de pulsos de LH, sendo esta controlada diretamente pelo neurohormônio hipotalâmico GnRH (Hafez e Hafez, 2004). Segundo Binelli *et al.* (2006), a dominância é definida como a capacidade de um folículo inibir o crescimento dos demais.

Quando as concentrações séricas de progesterona são basais, devido à luteólise do CL sob influência da prostaglandina  $F2\alpha$ , há um aumento da frequência no padrão pulsátil de LH, com pulsos que ocorrem a cada 40-70 minutos durante 2-3 dias (Hafez e Hafez, 2004). Dessa forma, o folículo dominante presente naquele momento se desenvolve e amadurece, ocorrendo a ovulação. O pico de LH, que ocorre junto ao início do estro, procede dois fatos independentes: a luteinização das células da granulosa e teca e a ruptura do folículo ovulatório, levando a ovulação do FD, que ocorre 10-14h após o estro, e posterior formação do CL (Gonçalves *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2011).

O início da fase lútea é conhecido como metaestro e caracteriza-se pela formação do CL a partir do folículo ovulado. Depois de 2 – 3 dias da ovulação, ocorre o desenvolvimento do CL, devido a luteinização das células da teca e granulosa e dessa forma, inicia a síntese e liberação da P4, para estabelecimento e manutenção da prenhez. Na ausência de um conceito, o CL regredirá, pela ação da prostaglandina liberada pelo útero (nos dias 17-18 do ciclo; Miyamoto *et al.*, 2009), e o ciclo se reiniciará novamente (Forde *et al.*, 2011).

O processo de luteinização resulta em mudanças estruturais e funcionais do folículo. Ocorre ruptura da membrana basal, que no folículo separa a camada da teca e da granulosa, e também mudanças bioquímicas, fazendo com que uma estrutura que secreta predominantemente andrógenos (teca) e estrógeno (granulosa) passe a secretar progesterona (Gonçalves *et al.*, 2008). O CL é a principal fonte de P4 em bovinos, sendo a concentração sérica de P4 próximo de zero em torno do estro e muito alta durante a fase lútea (Adams *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 2008). O corpo lúteo é mais sensível à ação luteolítica da prostaglandina à medida que envelhece (amadurece), ou seja, a partir do 10º dia do ciclo estral (Gonçalves *et al.*, 2008).

Durante o diestro, período de maior duração do ciclo, as concentrações de progesterona permanecem elevadas, e o desenvolvimento de ondas foliculares continua. Porém, o folículo dominante em crescimento não consegue ser ovulado, pois a frequência de pulsos de LH é insuficiente para estimular a diferenciação e a ovulação do FD, sofrendo regressão sob influência da progesterona (P4) produzida pelo CL (Binelli *et al.*, 2006). Ao entrar em atresia o FD perde a dominância e ocorre recrutamento de uma nova onda, dando continuidade ao ciclo estral.

#### **2.4 Manipulação do ciclo estral em doadoras de oócitos**

A técnica de OPU sofreu várias mudanças e desde seu estabelecimento, passa por estudos constantes na melhoria da eficiência no número e qualidade de CCOs coletados. Além disso, há evidências de que a origem do folículo é importante para determinar a qualidade do oócito (Sirard *et al.*, 1999).

Por isso, com o objetivo de aumentar as taxas de recuperação oocitária e a obtenção de oócitos de melhor qualidade, tem sido necessário a modificação dos protocolos hormonais com a finalidade de obter grupos de folículos e oócitos mais homogêneos e de melhor qualidade, principalmente em vacas *Bos taurus*, que geralmente possuem menor quantidade de folículos no momento da aspiração (Merton *et al.*, 2003). Estes protocolos obedecem aos mesmos princípios fisiológicos dos fármacos destinados à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), porém com algumas alterações (Seneda *et al.*, 2002). Entretanto, com o objetivo de controlar a onda de crescimento folicular, superestimular o crescimento desses folículos e favorecer a maturação dos oócitos (Goodhand *et al.*, 2000; Chaubal *et al.*, 2007; Sendag *et al.*, 2008).

A sincronização da emergência de uma nova onda folicular pode ser feita de forma mecânica através da ablação folicular, onde se faz a punção do folículo dominante, que pode ser folículos  $\geq 5$ mm (Bergfelt *et al.*, 1994; Hendriksen *et al.*, 2004) ou  $\geq 6$ mm (Barros e Nogueira., 2001), promovendo a emergência de uma nova onda folicular após 1 a 2 dias (Bergfelt *et al.*, 1994), ou farmacologicamente através da utilização de progesterona e estradiol. Neste caso, esses hormônios promovem a atresia dos folículos em desenvolvimento e a emergência de uma nova onda folicular 2 a 3 dias após, devido à ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (Bó *et al.*, 2002).

Estudos mostram que existe um maior número de oócitos disponíveis no momento da aspiração folicular e um maior número de estruturas recuperadas por sessão de OPU quando se utiliza o protocolo controle hormonal (BE+P4 – Bacelar *et al.*, 2010), além de evitar o procedimento extra de aspiração prévia para ablação do folículo dominante. Em um estudo recente, Ongaratto e colaboradores (2015), não observaram diferença entre os grupos controle hormonal e remoção do folículo dominante, porém, foi observado que o grupo com controle hormonal resultou em mais oócitos viáveis do que os grupos controle. Estes dados sugerem então, que a PIV melhora quando a OPU é realizada após sincronizar a emergência folicular (usando tratamento P4 + E2 ou ablação folicular).

Outra estratégia que vem sendo utilizada, principalmente em animais com baixo número de folículos, é a superestimulação ovariana utilizando as gonadotrofinas (p-FSH e eCG) em protocolos prévios a OPU (Bols *et al.*, 1998; De Roover *et al.*, 2005; Ongaratto *et al.*, 2015). Estes protocolos permitem que um grupo de folículos cresça de forma homogênea e que um maior número de oócitos ou oócitos com melhor competência seja obtido a partir dessas doadoras (Chaubal *et al.*, 2006; Sendag *et al.*, 2008). Existe uma gama de protocolos já relatados para estimulação ovariana, com aumento expressivo no número de folículos disponíveis para a aspiração (Sauvé, 1998) e com um maior número de oócitos recuperados (Blondin *et al.*, 2002). Entretanto, há uma grande variação quanto o tipo de gonadotrofina a ser utilizada, momento da superestimulação, dose(s) e momento da aspiração.

A resposta à superestimulação convencional é ideal quando o tratamento começa junto à emergência de uma nova onda folicular (Nasser *et al.*, 1993; Mapletoft *et al.*, 2002), ou seja, quando há um *pool* de folículos menores de 5mm (Singh *et al.*, 2004). Cada animal responde de uma forma diferente aos tratamentos com as gonadotrofinas (Mapletoft *et al.*, 2002). Segundo De Roover *et al.* (2005), animais com baixa população folicular tem uma tendência de produzir folículos maiores quando comparados aos animais com maior população folicular.

Há diversos estudos relatando o uso da superestimulação com as gonadotrofinas melhorando o número de oócitos coletados e embriões produzidos quando comparado com grupos controles não estimulados (Gibbons *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994; Goodhand *et al.*, 1999; Goodhand *et al.*, 2000). Além disso, a superestimulação promove o crescimento dos folículos (>5mm de diâmetro), o que parece ser importante para determinar a qualidade dos oócitos (Sirard *et al.*, 1999), pois nesta fase há mudanças nos CCOs que se parecem com uma atresia pequena ou muito leve e seus oócitos preservam uma boa competência de desenvolvimento (Vassena *et al.*, 2003).



Goodhand *et al.* (2000) relataram que a administração de FSH aumentou o número de folículos aspirados e o número de oócitos (categoria 1) recuperados, e também houve um incremento no número de embriões transferíveis quando foram utilizadas múltiplas doses. Dessa forma, este estudo mostra que o tratamento com múltiplas doses de FSH prévio a OPU melhora o número de folículos disponíveis para a aspiração e o número e a qualidade de oócitos recuperados e embriões produzidos. Goodhand *et al.* (1999) também relatam um aumento na taxa de produção de embriões após 3 dias de doses decrescentes de FSH. Além disso, Blondin *et al.* (2002) observaram uma variação na qualidade dos oócitos frente ao tempo entre a última aplicação de FSH e a OPU, com melhores porcentagens de oócitos competentes quando se estendeu o período de privação ao FSH, chamado de “coasting” por 48 h. Ainda, outra possibilidade para aumentar a eficiência da OPU foi proposta por Blondin *et al.* (2002), onde foi realizada a superestimulação prévia a OPU, com injeções múltiplas de FSH e uma injeção única de LH (6 h antes da OPU). A coleta de oócitos que haviam iniciado o processo de maturação aumentou grandemente a eficiência PIV. Chaubal *et al.* (2007) também observaram que a administração de LH 6 h antes da OPU aumentou ( $P < 0,05$ ) os oócitos de melhor qualidade, e na ausência de um CIDR, melhorou ( $P < 0,05$ ) a taxa de desenvolvimento de blastocistos.

Em um estudo Sendag e colaboradores (2008) compararam o uso de FSH e eCG nos protocolos prévios a OPU e concluíram que ambas as gonadotrofinas aumentaram o número de folículos disponíveis para a aspiração. Porém, com vantagens para os animais tratados com FSH. Boland *et al.* (1991) e Ongaratto *et al.* (2015) também relataram melhores respostas com os tratamentos superestimulatórios com FSH em comparação ao eCG. Entretanto, Martins e colaboradores (2012), observaram que o tratamento com eCG resultou em um maior número de oócitos viáveis em vacas Brangus e Holandesas. Além disso, Aller *et al.* (2012), relataram um maior número de oócitos recuperados e viáveis em vacas Angus prenhes lactantes após o tratamento com 1600UI de eCG. Outro aspecto que apresenta alterações nos protocolos é quanto ao momento da aplicação da eCG em relação à OPU, com relatos da aspiração no 2º (Martins *et al.*, 2012), 3º (Ongaratto *et al.*, 2015; Sonnewend *et al.*, 2016) e 4º (Sendag *et al.*, 2008) dia após a aplicação da eCG.

## **2.5 Fatores que influenciam a eficiência dos programas OPU/PIV**

As técnicas OPU/PIV tornaram-se tecnologias bastante difundidas no rebanho bovino. Entretanto, fatores como genética ou raça, estresse térmico, nutrição e estágio do ciclo estral podem influenciar significativamente na resposta a essas técnicas (Baruselli *et al.*, 2015; Mello *et al.*, 2016). Segundo Baruselli *et al.* (2015), o sucesso da PIV está diretamente relacionado ao número e à qualidade dos CCOs coletados.

A raça da doadora tem influência significativa, sendo que raças *Bos indicus* apresentam melhores resultados quando comparada às *Bos taurus* (Pontes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). Tamassia *et al.* (2003), demonstrou que, apesar da produção de oócitos e produção de embriões serem fatores independentes, a doadora de oócitos influencia na produção de blastocistos. As fêmeas *Bos indicus* recrutam um maior número de folículos por onda de crescimento folicular e possuem uma maior população de folículos menores de 5 mm em comparação às fêmeas *Bos taurus* (Bó *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2011). Isso pode ser devido à elevada concentração de IGF-1, que mesmo na presença de baixos níveis de FSH, pode promover maior mobilização e crescimento folicular nesses animais (Grázia *et al.*, 2012). Outro fator que pode ser relacionado são as concentrações do hormônio AMH, que tem como uma das suas funções promover uma redução na expressão do mRNA no receptor de FSH, exercendo um feedback negativo no desenvolvimento folicular e na proliferação das células da granulosa (Pellatt *et al.*, 2011). As concentrações plasmáticas de AMH têm sido utilizadas como um marcador da reserva folicular ovariana em bovinos, pois o mesmo apresenta um padrão de expressão (folículos preantrais e pequenos folículos antrais; Rico *et al.*, 2011).

O estresse térmico pode comprometer a fertilidade da fêmea, resultando em uma grande redução no desempenho reprodutivo. Pesquisadores atribuem os baixos resultados da PIV em gado *Bos taurus* ao estresse térmico (Ferreira *et al.*, 2010). Entretanto, resultados mostram que o estresse térmico também pode exercer efeito deletério sobre a dinâmica folicular ovariana e a competência de oócitos em bovinos *Bos indicus* (Torres-Júnior *et al.*, 2008). Segundo Lima (2012), a qualidade do oócito é dependente da sazonalidade, em virtude das alterações celulares como diminuição da maturação nuclear, desorganização do citoesqueleto e apoptose, serem oriundas de períodos em que os animais se encontravam em hipertermia. Outro trabalho realizado por Rubin *et al.* (2005), em doadoras da raça Nelore, relatou que as fêmeas produziram maior proporção de oócitos viáveis na época da primavera e verão quando comparado com a época do outono e inverno. Além disso, Rocha *et al.* (1998), ao avaliarem fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* submetidas a OPU durante o verão e inverno, observaram que *Bos taurus* apresentaram menor porcentagem de oócitos normais durante o

verão em relação ao inverno, sendo que nenhum embrião chegou ao estágio de mórula ou blastocisto. No entanto, para *Bos indicus*, não foi visto diferença na porcentagem de oócitos normais ou no desenvolvimento embrionário entre as estações do ano, concluindo que a alta temperatura e umidade ambiental durante o período do verão resultaram em declínio na qualidade embrionária em *Bos taurus*, não se observando o mesmo efeito em *Bos indicus*.

O estado nutricional e metabólico tem um papel importante podendo comprometer o sucesso da OPU/PIV, pois pode interferir nos padrões de crescimento folicular, na secreção de hormônios reprodutivos e na qualidade dos oócitos (Diskin *et al.*, 2003). Estudos associam o excesso ou falta de nutrição à redução da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras, e identificaram como causas determinantes o balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela diminuição do escore da condição corporal no pós-parto e pela própria condição corporal ao parto (Moreira *et al.*, 2000; Chagas *et al.*, 2007). Em outro estudo, Sales *et al.* (2015) mostraram que animais *Bos indicus* que receberam uma dieta de alta energia por um tempo prolongado tiveram a produção de embriões *in vitro* afetada comparada com animais que receberam uma dieta de manutenção. Ainda neste estudo notou-se que os oócitos de doadoras *Bos taurus* sofriam menos influência da dieta com alta quantidade de energia. O aumento da ingestão de matéria seca causa aumento do fluxo sanguíneo para o fígado, onde há grande metabolização dos hormônios esteroides, progesterona e estradiol. Portanto, quanto maior a ingestão de matéria seca, menores concentrações sanguíneas desses hormônios são observadas (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Outro fator que interfere na resposta à OPU/PIV é o estágio do ciclo estral no momento da OPU, que pode influenciar no tamanho do folículo, na taxa de recuperação, na qualidade dos oócitos e na produção *in vitro* de embriões (Seneda *et al.*, 2001; Machatkova *et al.*, 2004; Chaubal *et al.*, 2006). Um maior número de folículos e oócitos são encontrados logo após a emergência das ondas e antes da seleção do folículo dominante (Ginther *et al.*, 1996; Machatkova *et al.*, 2004). Isso se deve a maior taxa de recuperação após a aspiração de folículos pequenos (Seneda *et al.*, 2001). Maiores taxas de recuperação de oócitos são encontradas quando a OPU é realizada em folículos  $\leq 6$  mm de diâmetro (Seneda *et al.*, 2001). Segundo Edwards *et al.* (1980), menor volume, pressão e viscosidade em folículos pequenos podem estar relacionados à maior eficiência na recuperação de oócitos. No entanto, estudos mostram que apesar das menores taxas de recuperação, uma maior competência *in vitro* foi encontrada quando os oócitos foram obtidos a partir de folículos médios ( $>6$  mm de diâmetro), ou seja, durante a fase de dominância precoce do folículo dominante (Lonergan *et al.*, 1994; Castilho *et al.*, 2007; Hendriksen *et al.*, 2004; Sirard, 2012). Segundo Blondin e

Sirard (1995) e Sirard (2012), a competência dos oócitos tende a aumentar com o aumento do tamanho dos folículos. Portanto, estratégias estão sendo estabelecidas para manipular a dinâmica das ondas foliculares, como a sincronização da emergência folicular e superestimulação ovariana com gonadotrofinas, na busca da otimização da eficiência das técnicas de OPU/PIV, principalmente em animais que apresentam poucos folículos na OPU ou baixa taxa de conversão de oócitos em embriões.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da eCG na superestimulação prévia a OPU sobre o crescimento folicular e o potencial de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos aspirados.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito de diferentes doses (200, 400 e 800UI) de eCG sobre:

- Número e tamanho de folículos 72 h após a dose de eCG;
- Número de CCOs coletados por OPU;
- Número de CCOs viáveis recuperados por OPU;
- Cinética da fecundação *in vitro* e do desenvolvimento embrionário precoce;
- Número de oócitos viáveis;
- Avaliação da fecundação;
- Avaliação do desenvolvimento embrionário precoce.

#### **4- ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão e Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico *Animal Reproduction Science*.

**ARTIGO CIENTÍFICO****The use of eCG stimulation prior to ovum pick-up improve the follicular development and fertilization rate of bovine oocytes.**

Bibiana Noal Ribas<sup>1</sup>; Daniele Missio<sup>1</sup>; Isac Junior Roman<sup>1</sup>; Normélio Alves Neto<sup>2</sup>; Izaias Claro Junior<sup>2</sup>; Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>; Fabio Gallas Leivas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab Biotechnology of Reproduction, 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Zoetis, Brasil.

\*Corresponding author: Fabio Gallas Leivas, Rod. BR 472, Km 587, CP 118, 97.500-970, Uruguaiana/RS/Brasil: [fabioleivas@unipampa.edu.br](mailto:fabioleivas@unipampa.edu.br), phone +555534134321.

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of different doses of equine chorionic gonadotrophin (eCG) prior to ovum pick-up (OPU), on follicular development, number and quality of oocytes recovered, fertilization rate and early embryo development *in vitro*. Sixteen Braford cows underwent 4 OPU sessions (cross over) to evaluate the eCG dose effect (Control = zero, eCG200 = 200IU of eCG, eCG400 = 400IU of eCG, and eCG800 = 800IU of eCG). The wave of follicular growth was synchronized with P4 device insert and estradiol benzoate (D0). On D3, the donors received the eCG dose and on D6, the P4 device was removed and the OPU performed. Viable oocytes were IVM and IVF according to treatments. After IVF it was evaluated the fertilization and cleavage rates, time of the first cleavage and cell number at 48 hours. There was no difference in the number of follicles, in the quantity and morphological quality of the oocytes between treatments ( $P > 0.05$ ). The oocyte recovery rate was similar between the eCG treated groups, but lower than the Control group ( $P < 0.0001$ ). However, the eCG800 had a higher follicle rate  $> 6$ mm in diameter ( $P < 0.00001$ ). In addition, the eCG800 presented a higher rate in normal fertilization ( $P < 0.01$ ) and lower rate of polyspermy ( $P < 0.02$ ). The cleavage rate of the eCG800 was higher than the other groups treated and similar to the Control. In conclusion, eCG800 increased the proportion of follicles  $> 6$  mm giving the highest rate of normal fertilization and reduced the rate of polyspermia, without prejudice to the early embryonic development *in vitro*.

**Keywords:** equine chorionic gonadotrophin, OPU, bovine embryo, quality oocyte, superstimulation, IVP.



## 1. Introduction

The ultrasound-guided follicular aspiration (ovum pick-up, OPU) allows the *in vitro* embryo production (IVP) can be performed on a random day of the estrous cycle. It is known that the number and size of follicles available at the time of OPU vary according to the phase of follicular dynamics, and that more than 85% of the follicles may be atretic. The protocols prior to aspiration may be an increment to improve the efficiency of this technique, where most of them were developed with the purpose of controlling follicular wave growth, superstimulating the growth of these follicles and also some promote the oocyte maturation (Goodhand et al., 2000; Chaubal et al., 2007; Sendag et al., 2008).

Superstimulation treatments using exogenous gonadotrophins have the purpose of increasing the number of follicles for aspiration as well as manipulating the follicular size and consequently maximizing the number and quality of the oocytes obtained per cow per OPU session (Chaubal et al., 2006, Sendag et al., 2008). Oocyte competence has been associated with follicular growth (Lonergan et al, 1994; Blondin et al, 2002; Sirard, 2012). In addition, studies have shown that oocytes from medium and large follicles (> 5-6 mm in diameter) develop better when they are fertilized *in vitro* (Lonergan et al., 1994; Hagemann et al., 1999; Hendriksen et al., 2000, Seneda et al., 2001, Machatkova et al., 2004; Castilho et al., 2007).

The equine Gonadotrophin Chorionic (eCG) and the porcine FSH (p-FSH) promotes follicular growth and can improve the efficiency of the OPU/PIV system. Despite the great variability in the superstimulation response, p-FSH, in general, presents good results when compared to eCG (De Roover et al., 2005; Sendag et al., 2008; Ongaratto et al., 2015), especially if the FSH follicular deprivation period was observed before OPU (i.e “coasting period”, Nivet et al., 2012). However, besides having a very high cost and short half-life, p-FSH requires multiple applications, limiting its applicability. Already the eCG can be used in

a single dose because of its long half-life, which can reach up to 46 hours in the cow (Murphy and Martinuk, 1991).

Another important aspect is that eCG has both FSH and LH activity, and this causes it to stimulate steroidogenesis and follicular growth (Duffy et al., 2004). In addition, it can benefit follicular and oocyte maturation (Baruselli et al., 2008; Murphy, 2012). However, there is a difficulty in controlling the “coasting period”. There is a large variation in the dose of eCG used in the literature with reports of 3000 IU (Sendag et al., 2008), 1600 IU (Aller et al., 2012), 800 IU (Ongaratto et al., 2015) and 400 IU (Reis et al., 2010; Martins et al., 2012; Sonnewend et al., 2016; Gonçalves et al., 2017) which leads to great divergence in the results. In addition, there are no studies comparing different doses of eCG and its effect on follicular growth and embryo development potential *in vitro*. In this sense, our hypothesis is that stimulation with eCG increases the proportion of medium and large follicles available for OPU and that this is dependent on the dose of eCG used. The definition of the ideal dose is a fundamental point for its correct use.

In this context, the objective of this study was to compare ovarian response, oocyte quality, as well as fertilization rate and early embryonic development kinetics in Braford cows superstimulated with different doses of eCG prior to follicular aspiration.

## **2. Materials and methods**

All chemicals used in this study purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

### **2.1 Experimental location and animals**

This experiment was conducted at the “*Laboratório de Biotecnologia da Reprodução*” (BIOTECH) of *Universidade Federal do Pampa* (UNIPAMPA), Uruguiana,

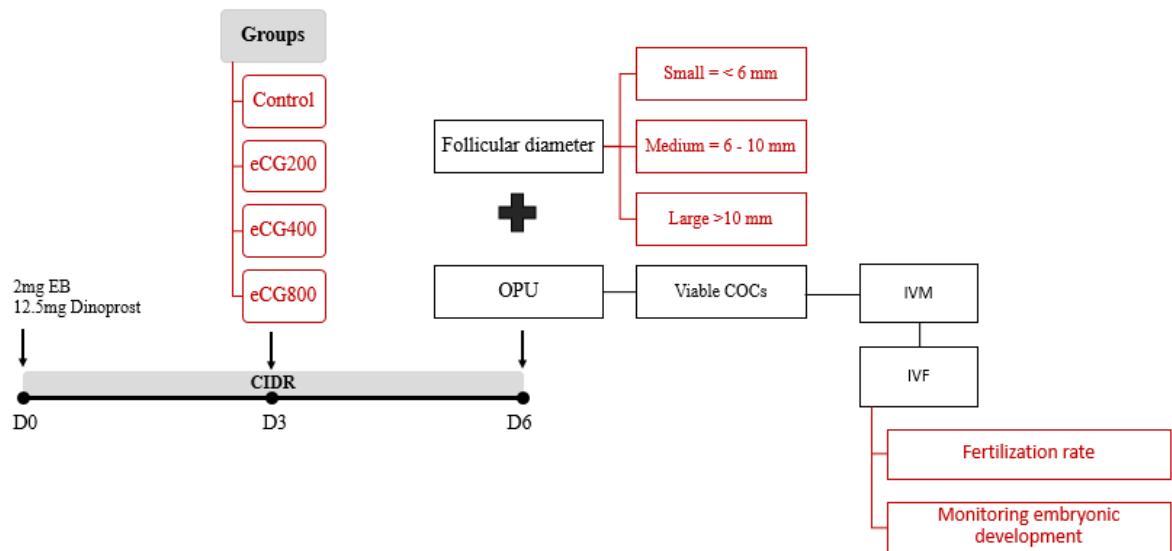
Brazil, from July to September 2016 (winter in the Southern Hemisphere). Sixteen Braford donor ( $3/8$  *Bos indicus*:Brahman and  $5/8$  *Bos taurus*:Hereford) cows aged 4-8 years were used. The animals had a body condition score of 5 as assessed on a 1-9 scale (Richards et al., 1986). Cows were kept on an *ad libitum* grazing regime without supplementation. Cyclicity was confirmed by ultrasonographic examination prior to beginning of the experiment.

## 2.2 Experimental design and treatment protocols

To reduce the influence of the individual variation on the results of the experiment, four replications were performed, so that all the animals went through all the treatments (cross over design). The aspiration sessions were performed with an interval of 15 days. All *experimental* protocols were performed in accordance with the National Council of Control in Animal Experimentation of Brazil (CONCEA, CEUA Unipampa, protocol number 033/16).

According to Fig. 1, the onset of the synchronization protocol (D0), the donors received 2 mg of estradiol benzoate IM (EB; Gonadiol®, Zoetis, Brazil), 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM (Lutalyse®, Zoetis, Brazil) and an intravaginal P4 device (CIDR®, Zoetis, Brazil). On Day 3 (D3), the donors were divided into 4 groups according to the dose of eCG (Control = zero, eCG200 = 200IU of eCG, eCG400 = 400IU of eCG, and eCG800 = 800IU of eCG). On Day 6 (D6), the P4 device was removed and the donors subjected to OPU, through ultrasound-guided follicular aspiration. Before OPU the ovarian follicles were visualized, measured and classified into three classes according to diameter (<6 mm, 6-10 mm, >10 mm). Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained were classified according to the appearance of the cytoplasm and number of cumulus cells. COCs considered viable were referred to the IVP laboratory and submitted to *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF). After the IVF period, 50% of the oocytes from each treatment were evaluated for fertilization rate

and the other oocytes were cultured *in vitro* (for 48 h) and evaluated for cleavage rate, time of first cleavage (h), and number of cells at 48 hpi.



**Fig. 1:** Experimental design and treatment protocols.

### 2.3 Follicular diameter, OPU and oocyte classification

Before each aspiration session, feces were removed from the rectum and the perineal area was cleaned with tap water and 70% ethanol. Prior to follicle aspiration, each cow received caudal epidural anesthesia using 5 mL of 2% lidocaine. Immediately before OPU, each ovary was located by rectal palpation and was examined by ultrasonography using a portable scanner (Aloka SSD500, Aloka, Tokyo, Japan) with 5 MHz convex array transducer housed in a plastic vaginal probe. All visible follicles were measured and classified according to their diameters (small = <6 mm, medium = 6 to 10 mm, and large >10 mm, Machatkova et al., 2004). All the follicles were aspirated together.

The same operator performed all OPU procedures using a disposable 20-gauge hypodermic needle (WTA, Brazil), connected to a conical tube (50 mL, Falcon, USA) via

silicon tubing (1.20 m). The aspiration performed at a vacuum pressure of 100 mmHg, equivalent to flow rate of 10-15 mL of H<sub>2</sub>O/min generated by a vacuum pump (WTA, Brazil). *Aspiration* medium was DMPBS (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil) supplemented with heparin (10 IU/mL) and 5% fetal bovine serum (FBS; Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil). The tube was placed inside a tube heater (WTA, Brazil) at a temperature of 35°C.

After each aspiration, the recovered follicular fluid was passed through an embryo filter (WTA, Brazil) that was subsequently washed with DMPBS (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil) supplemented with heparin and FBS (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil). Immediately after recovery, COCs were classified according to the characteristics of cumulus and ooplasm cells (Seneda et al., 2001), under a stereomicroscope, as follows: Good — more than three layers of cumulus cells; Regular — at least one layer; Denuded — partly or not covered by cumulus cells; and Atretic — dark cumulus oophorus and signs of cytoplasmic degeneration. After evaluation, the number of atretic oocytes were recorded, these COCs were discarded, and the viable COCs were recorded according to each treatment (Control, eCG200, eCG400 and eCG800) and submitted to IVM and IFV.

## **2.4 *In vitro* embryo production (IVP)**

### **a. *In vitro* maturation (IVM)**

*In vitro* maturation (IVM) was performed in groups, according to the eCG treatment, in drops of 80 µL TCM-199 supplemented with 10% estrus mare serum, 5 µg/mL of porcine follicle-stimulating hormone, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá), 50 µg/mL of porcine pituitary luteinizing hormone, LH-P (Lutropin-V®, Bioniche Animal Health), 100 µg/mL of human epidermal growth factor (hEGF), and 22 µg/mL

pyruvate and gentamicin. The maturation period was 24 h at 39°C in a gaseous atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity.

#### **b. Sperm selection**

The semen straws of a bull *Bos taurus* with proven fertility were thawed in a water bath at 35°C for 20 seconds and homogenized. Subsequently the semen was submitted to the Percoll gradients 90, 60, and 30% (Folchini et al., 2012). Then, the semen was centrifuged for 5 minutes at 2200 x g. The pellet was resuspended on Talp-FERT and centrifuged again for one minute at 2200 x g. The 100 µL pellet, resulting from the second centrifugation, was homogenized and used for *in vitro* fertilization (IVF).

#### **c. *In vitro* fertilization (IVF)**

After IVM period, the CCOs were transferred to drops containing 80 µL Talp-FERT (Parrish et al., 1986), 22 µg/mL pyruvate, 6 mg/mL BSA, 10 µg/mL heparin, 20 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine and 2 µM epinephrine under mineral oil. The sperm dose used was  $1 \times 10^6$  sperm cells/mL and the IVF day was considered as day zero (D0). The sperm cells and oocytes co-culture was performed for 18 h at 39°C with saturated humidity and gaseous atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### **d. Fertilization rate**

Fertilization rate was evaluated after 18 h of co-incubation of the oocytes and sperm. For the evaluation, the probable zygotes were stripped by successive pipetting and then transferred to modified TCM 199 medium with 10 µg/mL of Hoechst 33342. They were incubated for 10 min at 39°C and then taken to the epifluorescence microscope at 400X magnification with the excitation wavelength at 365 nm and the emission wavelength at 410

nm. As described by Giotto et al. (2015) was considered the total fertilization rate when the oocyte had two or more pro nuclei. However, for normal fecundation rate was considered the oocyte with one spermatozoa penetrated or oocytes with only two pro nuclei or fused nuclei, and polyspermy, all oocytes with two or more spermatozoa penetrated.

#### **e. Monitoring embryonic development**

After the IVF period, the *cumulus oophorus* cells were removed by successive pipetting and potential zygotes were cultivated in SOFaaci (Holm et al., 1999). The embryos were transferred individually to the micro-wells of a well-of-the-well (WOW) culture dish (Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary) and cultured in groups under mineral oil at 39°C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 48 h. The culture dishes were incubated on the stages of compact digital inverted microscopes designed for use inside of the incubator, allowing for automated time-lapse analysis (Primo Vision time-lapse embryo monitoring system; Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary), where embryo images were taken every 5 minutes. Were evaluated the kinetics of embryonic development at up 48 hours post insemination (hpi), considering the cleavage rate (structures with 2 or more cells), the time of the first cleavage (in hours relative to the time of IVF) and the number of cells at 48 h.

### **2.5 Statistical analyses**

All data were performed by ANOVA and the differences compared by Tukey's test, to verify the statistical differences between the different eCG treatments. The variables evaluated were the number of follicles in each category in the time of OPU (small, medium, and large), total follicles aspirated, COC recovered (total and quality) per treatment and per

donor/session, and fertilization and cleavage rate, starting from the first cleavage (h) and cell number at 48 h in early embryonic development *in vitro*. For the analysis, continuous data were tested for normality. The individual effect of donor was included as a random effect. Means  $\pm$  SEM used to describe all of the response variables. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### **3. Results**

#### **3.1 Follicles at the time of OPU**

The mean number of follicles visualized per donor at the time of OPU was similar between groups Control, eCG200, eCG400, and eCG800 (Table 1).

However, an increase in the proportion of medium (6-10 mm) and large follicles (>10 mm) was observed when using 800IU of eCG in relation to the groups Control, eCG200, and eCG400 (Fig. 2).

#### **3.2 Aspirated follicles at the time of OPU and recovered COC**

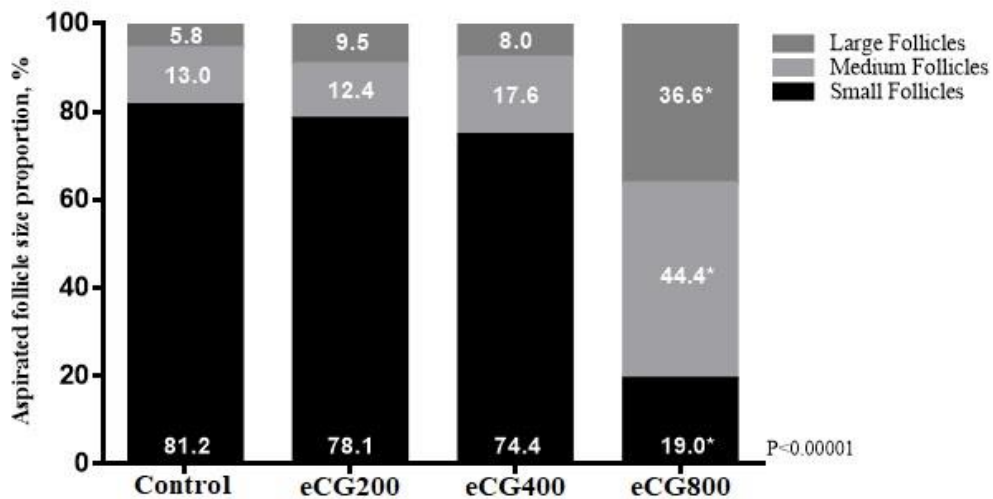
The oocyte recovery rate was higher ( $P < 0.001$ ) when eCG was not used in relation to the other groups. However, the mean number of CCOs recovered per donor per OPU session, as well as the rate of viable CCOs between the different treatments was similar (Table 1).

#### **3.3 Evaluation of the fertilization and kinetics of embryonic development**



According to Fig. 3 the total fertilization rate was similar between treatments. However, in the evaluation of the normal fertilization rate, the eCG800 group presented superior results when compared to the Control and eCG400 and similar to the eCG200. Additionally the polyspermy rate was lower in the group eCG800 compared to Control.

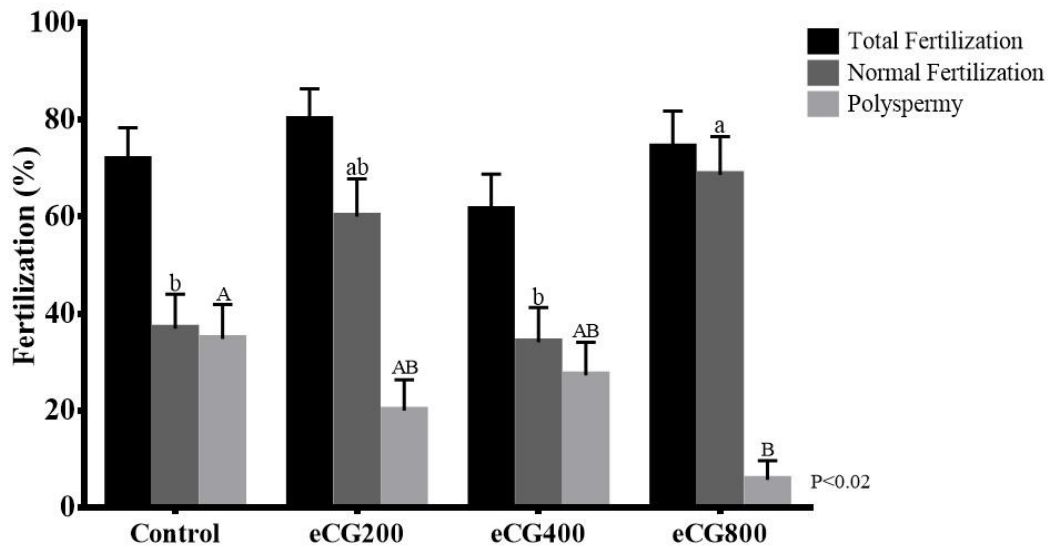
In the evaluation of the kinetics of embryonic development through the monitoring of presumptive zygotes, the cleavage rate of the group eCG800 ( $68.6 \pm 7.9$ ) was higher than the eCG200 ( $40.5 \pm 7.7$ ) and eCG400 ( $62.5 \pm 7.0$ ) groups, and similar to the Control ( $75.6 \pm 6.8$ ). There was no difference between groups at the time of the first cleavage ( $33.9 \pm 6.2$ ;  $33.5 \pm 5.86$ ;  $34.5 \pm 6.62$ ;  $34.4 \pm 6.3$  hours;  $P = 0.951$ ) and cell number at 48 hpi ( $4.3 \pm 0.54$ ;  $3.5 \pm 0.53$ ;  $4.5 \pm 0.48$ ;  $4.13 \pm 0.4$ ;  $P = 0.65$ ) among the Control, eCG200, eCG400, and eCG800 groups, respectively.



**Fig. 2-** Proportion of small (< 6 mm), medium (6 - 10 mm) and large (> 10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Bradford cows treated with different eCG treatments (Control, eCG200, eCG400, and eCG800). \* $P < 0.00001$ .

**Table 1** - Results (mean  $\pm$  SEM) of ovum pick-up (OPU) in Braford cows superstimulated with different eCG dose (Control, eCG200, eCG400, and eCG800)

	Control	eCG200	eCG400	eCG800	<i>P</i> -value
No. OPU section	16	16	16	16	
No. aspirated follicles	138	137	176	142	
No. aspirated follicles/donor/session	8.62 $\pm$ 3.8	8.56 $\pm$ 3.4	11 $\pm$ 4.2	8.88 $\pm$ 4.2	= 0.245
No. COC recovered	126	105	116	91	
No. COC/donor/session	7.88 $\pm$ 1.45	6.57 $\pm$ 1.18	7.25 $\pm$ 1.0	5.75 $\pm$ 0.75	= 0.582
Recovery rate (COC/aspirated follicles), %	91.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	76.6 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	65.9 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>	64.1 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	< 0.001
Viable oocyte rate, %	79.4 $\pm$ 3.6	82.9 $\pm$ 3.7	83.6 $\pm$ 3.5	84.6 $\pm$ 3.8	= 0.745
No. viable COC/donor/session	6.25 $\pm$ 1.12	5.44 $\pm$ 1.20	6.06 $\pm$ 0.85	4.87 $\pm$ 0.84	= 0.768



**Fig. 3:** Evaluation of total fertilization rate, normal fertilization and polyspermy of oocytes obtained from Braford cows overestimated with different eCG dose (Control, eCG200, eCG400, and eCG800).

a, b: Different letters in the same color bars show significant difference ( $P = 0.0027$ ).

A, B: Different letters in the same color bars show significant difference ( $P = 0.0164$ ).

#### 4. Discussion

The acquisition of oocyte developmental potential has been associated with follicular growth (Lonergan et al, 1994; Sirard, 2012). The results of the present study confirm the positive effect of superstimulation on bovine donors with eCG prior to OPU. Donors who received 800IU of eCG had an increase in the proportion of medium and large follicles (> 6 mm in diameter). Although eCG-treated animals had a lower rate of oocyte recovery, the average of viable COCs per donor was not affected when eCG was used. In addition, when the *in vitro* fertilization rate was evaluated, the animals treated with 800IU of eCG showed oocytes with higher potential for development. These data indicate this is an alternative protocol for improving the efficiency of the OPU/IVP system.

The superstimulation, have the purpose to obtain a greater number of follicles as well as an increase in the proportion of medium and large follicles, which have oocytes with more competent (Chaubal et al., 2006; Sendag et al., 2008). In this sense, the dose of eCG800 was shown to be effective (compared to Control and other eCG doses), providing a change in the proportion of ovarian follicles, increasing the proportion of medium and large follicles, confirming our hypothesis that effect of eCG is dose dependent. Based on the knowledge that oocytes from follicles > 6 mm in diameter have a higher *in vitro* potential development (Lonergan et al., 1994; Hagemann et al., 1999; Hendriksen et al., 2000, Seneda et al., 2001, Machatkova et al., 2004; Castilho et al., 2007), the eCG800 may be considered effective to cause the best superstimulation prior to OPU. This aspect becomes very important, especially in animals with low oocyte production in OPU, where the superstimulation does not cause an increase in the number of follicles but in the oocyte quality.

The morphological quality of the COCs was not affected by the eCG dose, however, in the evaluation of the *in vitro* fertilization capacity, the oocytes obtained from eCG treated animals showed an improvement in the fertilization rate and a consequent decrease in the rate

of polyspermy, showing that these oocytes were positively affected by follicular growth caused by eCG dose, mainly at the dose of 800IU of eCG. These data corroborate with studies reporting that oocyte competence tends to improve with increasing follicle size (Blondin e Sirard, 1995; Blondin et al, 2002; Sirard, 2012). Considering that this effect can be attributed to the change in the profile of the abundance of mRNA of genes related to quality of oocytes (Nivet et al., 2012; Fernandes et al., 2017) the use of eCG contributed to improve oocyte competence. In mammals, especially in mono ovulatory species such as cattle, it established that the follicular environment has a clear impact on oocyte development capacity and that the quality of oocyte maturation influences the IVF process. The data obtained in the present study provide evidence of an interaction between the use of eCG800 before OPU on follicular development and oocyte competence, which influences further *in vitro* fertilization processes.

The number and quality of oocytes recovered by aspiration depend mainly on the stage of the follicular wave in which the animals are at the time of OPU (Seneda et al., 2001; Bó et al., 1995). Bols et al. (1997) and Hagemann (1999) suggest that the production of blastocysts is greater when COCs are recovered shortly after the onset of the wave when the follicles are not under the influence of a dominant follicle. In our study, the donors did not present a dominant follicle, since the follicular wave was synchronized. Due to this synchronization, one can observe the marked effect of increasing doses of eCG in relation to the Control, which allowed the growth of the follicles according to each treatment. Thus, it could be observed that the higher the dose of eCG used, the greater the follicular growth. Aller et al. (2012), showed a positive effect of the use of eCG (1600 IU) on Angus cows suckling pregnant, as well as Gonçalves et al. (2017), that observed an increase on *in vitro* production potential when they used 400 IU of eCG prior to OPU, however, these authors did not evaluate the effect of different doses of eCG. In our study, the doses of eCG used may be considered low and it could be observed that all animals responded to the eCG

superstimulation protocol, different from that observed by Sendag et al. (2008), who used 3000 IU of eCG for donor superstimulation and reported resistance of some animals to the protocol. Doses greater than 800 IU of eCG may cause excessive superstimulation and as a consequence hamper oocyte collection or decrease the response with repeated use of eCG in cattle.

The superstimulation protocols may vary in relation to the amount of gonadotrophin to applied, the number of applications performed and the interval between the last application and the aspiration. Thus, we can show another important aspect in the quality and competence of oocytes that may have been the interval between administration of eCG and OPU (72 h). It has been show that oocyte competence and blastocyst rates are improved if cows are deprived of FSH for about 36 to 48 h prior OPU in a procedure called “coasting” (Blondin et al., 2002) using p-FSH. When using eCG, depending on the protocol used and considering the long half-life of this gonadotrophin, this may not be possible to occur (Ongaratto et al., 2015). However, this effect was not observed in our experiment because there were no losses in the kinetics of the initial embryonic development and at the time of the first cleavage when using eCG. It is known that the kinetics of early embryonic development is a good indicator of oocyte viability (Lonergan et al. 1999; Barreta et al. 2012), since embryos that cleave earlier have a greater chance of reaching the blastocyst stage, presenting even greater cryotolerance. Nevertheless, the eCG800 had cleavage rates above the other doses of eCG and similar to the Control confirming that the use of eCG did not impair the kinetics of early embryonic development.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the superstimulation protocol using 800IU of eCG prior to follicular aspiration increased the proportion of follicles > 6 mm in diameter. Additionally, oocytes

from these follicles had a higher rate of fertilization and a lower rate of polyspermy, which favored the initial embryonic development. This indicates increased greater oocyte viability, making it an alternative protocol for ovary overstimulation before OPU.

### **Acknowledgments**

The authors thank to Zoetis Animal Health - Brazil by the donation of all the hormonal products applied in this study and at Fepagro (*Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul* - State Agricultural Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul) for the loan of animals.

### **References**

- Aller, J. F., Mucci, N. C., Kaiser, G. G., Callejas S. S., Alberi, R. H., 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 133,10-5.
- Barreta, M.H., Gasperin, B.G., Rissi, V.B., Cesaro, M.P., Oliveira, J.F., Gonçalves, P.B.D., Bordignon, V., 2012. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. *Exp. Cell Res.* 318, 2049-58.
- Baruselli, P.S., Jacomini, J.O., Sales, J.N.S., Crepaldi, G.A., 2008. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada* 3,146-67.
- Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., Sirard, M.A., 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 66, 38-43.

- Blondin, P., Sirard, M.A., 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 54-62.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M.F., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 193-204.
- Bols, P. E., Ysebaert, M. T., Van Soom, A., Kruif, A., 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47,1221-36.
- Castilho, C., Assis, G.S., Garcia, J.M., 2007. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência in vitro de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 288-94.
- Chaubal, S.A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E., Rezamand, P., Tian, X., Yang X., 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67,719-28.
- Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E., Riesen, J. W., Tian, X., Yang, X., 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65, 1631-48.
- De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P., Dessy, F., 2005. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim. Reprod. Sci.* 86, 13-25.
- Duffy, P., Crowe, M.A., Austin, E.J., Mihm, M., Boland, M.P., Roche, J.F. 2004. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* 61, 725-734.

- Fernandes, C.A.C., Gonçalves, F.C., Caixeta, E.S., Figueiredo, A.C.S., Viana, J.H.M., Ribeiro, J.R., Silva, R.M., 2017. eCG stimulation prior to ovum pick-up on expression of oocyte quality markers in immature cumulus-oocyte complexes. *Anim. Reprod.* 14, 747.
- Folchini, N.P., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.R., Martin, D., Spiazzi, C.C., Brum, S., 2012. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36,239-244.
- Giotto, A. B., Brum, D.S., Santos, F.W., Guimarães, A.C.G., Gonçalves, C.G.M., Pavin, C.U.M., Folchini, N.P., Moyses, A.B., Missio, D., Leivas, F.G., 2015. Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Semina: Ciências Agrárias* 36, 4277-88.
- Gonçalves, F.C., Fernandes, C.A.C., Figueiredo, A.C.S., Caixeta, E.S., Palhão, M.P., Neves, J.P., Costa, D.S., 2017. Ovum pick up and quality of oocytes in stimulated donors with equine corionic gonadotrofin. *Anim. Reprod.* 14, 735.
- Goodhand, K. L., Staines, M. E., Hutchinson, J. S., Broadbent, P. J., 2000. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim. Reprod. Sci.* 63, 145-58.
- Hagemann, L. J., 1999. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51, 449-59.
- Hagemann, L. J., Beaumont, S. E., Berg, M., Donnison, M. J., Ledgard. A., Peterson, A. J., Schurmann, A., Tervit, H. R., 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 451-8.



- Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Steenweg, W. N., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53, 11-20.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., Callesen, H., 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., Boland, M. P., 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159-67.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., Gordon I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48-53.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., Tomanek, M., 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61, 329-335.
- Martins, C.M., Reis, P.O., Sales, J.N.S., Sala, R.V., Vieira, L.M., Baruselli, P.S., 2012. Effect of follicular growth wave synchronization and treatment with bST or eCG in the OPU-IVP of Nelore, Brangus and Holstein donors. *Anim. Reprod.* 9, 563.
- Murphy, B. D., Martinuk, S. D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev.* 12, 27-44.
- Murphy, B.D., 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* 9, 223-230.

- Nivet, A. L., Bunel, A., Labrecque, R., Belanger, J., Vigneault, C., Blondin, P., Sirard, M. A., 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143,165-71.
- Ongaratto, F. L., Rodrigues-Villamil, P., Tribulo, A., Bó, G.A., 2015. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. *Anim. Reprod.* 12, 876-883.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., First, N. L., 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Reis, P.O., Martins, C. M., Gimenes, L. U., Sales, J. N. S., Baruselli, P. S., 2010. Effect of synchronization at the beginning of follicular wave emergence on OPU-IVP of Nelore (*Bos indicus*) and Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*). *Acta Sci.Vet.* 38, 764.
- Richards, M.W., Spitzer, J.C., Warner, M.B., 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62, 300-6.
- Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Hadel, K. G., Niemann, H., 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 208-14.
- Seneda, M. M., Esper, C. R., Garcia, J. M., Oliveira, J. A., Vantini, R., 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 37-43.
- Sirard, M. A., 2012. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reprod. Domest. Anim.* 47,148-55.

Sonnewend, F., Andrade, J.P.N., Rezende, R.A., Borges, A.N., Silva, A.L., Mello, M.R.B.,  
2016. Impact of injectable P4 and eCG protocol before OPU on in vitro production of  
bovine embryos. *Anim. Reprod.* 13, 472.

## 5- CONCLUSÕES

A superestimulação de vacas Braford utilizando 800UI de eCG em um protocolo prévio à aspiração folicular proporcionou:

- Maior número de folículos médios (> 6 mm) e grandes (> 10 mm);
- Melhoria na taxa de fecundação normal e diminuição da taxa de polispermia;
- Incremento na taxa de clivagem em relação as demais doses de eCG;
- Correta cinética de desenvolvimento embrionário precoce após a fecundação *in vitro* dos oócitos obtidos por OPU.

## **6- PERSPECTIVAS**

Baseado nos resultados obtidos, as perspectivas para futuros trabalhos são:

- Avaliar o efeito da dose de 800 UI de eCG sobre o desenvolvimento embrionário até blastocisto;
- Avaliar a porcentagem de embriões a serem transferidos;
- Avaliar a taxa de prenhez após TE destes embriões.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 94, p. 177–88, 1992.

ADAMS, G.P., JAISWAL, R., SINGH, J., MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p.72-80, 2008.

ALLER, J. F., MUCCI, N. C., KAISER, G. G., CALLEJAS S. S., ALBERI, R. H. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. **Anim Reprod Sci**, v. 133, p. 10-5, 2012.

BACELAR, D., MAX, M.C., PADILHA, L.C., BARREIROS, T.R.R., SENEDA, M.M. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 163-72, 2010.

BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v.76, p.1903–21, 1998.

BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in bos indicus cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483-96, 2001.

BARUSELLI, P.S., GIMENES, L.U., SALES, J.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p. 205-11, 2007.

BARUSELLI, P.S., VIEIRA, L.M., BATISTA, E.O.S., FERREIRA, R.M., SALES, J.N.S., GIMENES, L.U., TORRES-JUNIOR, J.R.S., MARTINS, C.M., SÁ FILHO, M.F., BÓ, G.A. Updates on embryo production strategies. **Anim Reprod**, v.12, p.375-82, 2015.

BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol Reprod**, v. 66, p. 120-6, 2002.

BERFELT, D. R., LIGHTFOOT, K. C., ADAMS, G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 895-907, 1994.

BINELLI, M., IBIAPINA, B.T., BISINOTTO, R.S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Sci Vet**, v. 34, p. 1-7, 2006.

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

BLONDIN, P., BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., BARNES, F., SIRARD, M. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol Reprod**, v. 66, n. 38-43, 2002.

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

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.307-26, 2003.

BOLAND, M. P., GOULDING, D., ROCHE, J. F. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5-17, 1991.

BOLS, P.E., YSEBAERT, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., DE KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-95, 1998.

CASTILHO, C., ASSIS, G. S., GARCIA, J. M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência in vitro de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.59, p. 288-94, 2007.

CAMPOS-JÚNIOR, P.H.A., ASSUNÇÃO, C.M., VIANA, J.H.M. Foliculogênese: da migração das células germinativas primordiais à aplicação de tecnologias reprodutivas em mamíferos. **CES Revista**, v. 23, p. 35- 44, 2009.

CHAGAS, L.M., BASS, J.J., BLACHE, D., BURKE, C.R., KAY, J.K., LINDSAY, D.R., LUCY, M.C., MARTIN, C.B., MEIER, S., RHODES, F.M., ROCHE, J.R., THATCHER, W.W., WEBB, R. Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **J Dairy Sci**, v.90, p.4022-32, 2007.



CHAUBAL, S. A., MOLINA, J. A., OHLRICH, C. L., FERRE, L. B., FABER, D. C., BOLS, P. E., RIESEN, J. W., TIAN, X., YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1631-48, 2006.

CHAUBAL, S.A., FERRE, L. B., MOLINA, J. A., FABER, D. C., BOLS, P. E., REZAMAND, P., TIAN, X., YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v. 67, p. 719-28, 2007.

DE ROOVER, R., GENICOT, G., LEONARD, S., BOLS, P., DESSY, F. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Anim Reprod Sci**, v. 86, p. 13-25, 2005.

DISKIN, M.G., MACKAY, D.R., ROCHE, J.F., SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.345-70, 2003.

DUFFY, P., CROWE, M.A., AUSTIN, E.J., MIHM, M., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology** v.61, p. 725-734, 2004.

EDWARDS, R. G., STEPTOE, P.C., FOWLER, R. E., BAILIE, J. Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates. **Br J Obstet Gynaecol**, v.87, p.769-79, 1980.

FAIR, T., HULSHOF, S. C. J., HYTTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat Embryol**, v. 196, p. 327-36, 1997.

FERREIRA, R.M., AYRES, H., CHIARATTI, M.R., RODRIGUES, C.A., FREITAS, B.G., MEIRELLES, F.V., Baruselli, P.S. Estresse térmico e produção embrionária em vacas de leite de alta produção. **Acta Sci Vet**, v.38, p.304-15, 2010.

FORDE, N., BELTMAN, M.E., LONERGAN, P., DISKIN, M., ROCHE, J.F., CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 124, p.163-9, 2011.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v.50, p.225-32, 1994.

\_\_\_\_\_. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 135-63, 2003.

GIBBONS, J. R., BEAL, W. E., KRISHER, R. L., FABER, E. G., PEARSON, R. E., GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405-10, 1994.

GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v.87, p.223-30, 1989.

GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 55, p. 1187-94, 1996.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol Reprod**, v. 63, p.383–89, 2000.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, p. 475–82, 2002.

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2º Ed. São Paulo:Roca, 2008. 408 p.

GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v.51, p. 951-61, 1999.

GOODHAND, K.L., STAINESA, M.E., HUTCHINSONB, J.S.M., BROADBENTA, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Anim Reprod Sci**, v. 63, p.145-58, 2000.

GRÁZIA, J.G.V., GHETTI, A.M., PAIM, C.A.S., ARASHIRO, E.K.N., CAMARGO, L.S.A., GARCIA, R.M.G., VIANA, J.H.M. Associação da concentração de IGF plasmático e produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Gir. **Anim Reprod**, v.9, p.404, 2012.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 530p.

HENDRIKSEN, P.J.M., STEENWEG, W.N.M., HARKEMA, J.C., MERTON, J.S., BEVERS, M.M., VOS, P.L.A.M., DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 6, p. 909-20, 2004.

HILLIER, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Hum Reprod**, v.9, p.188–91, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **Int Rev Citol**, v. 124, p. 43-101, 1991.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **J Reprod Fertil**, v. 34, p. 39-54, 1987.

LIMA, R.S. **O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa.** 2012. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

LONERGAN, P., KHATIR, H., PIUMI, F., RIEGER, D., HUMBLLOT, P., BOLAND, M. P. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 37, p. 48-53, 1994.

LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

MACHATKOVA, M., KRAUSOVA, K., JOKESOVA, E., TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329-35, 2004.

MAPLETOFT, R. J., STEWARD, K. B., ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, p. 601-11, 2002.

MARTINS, C.M., REIS, P.O., SALES, J.N.S., SALA, R.V., VIEIRA, L.M., BARUSELLI, P.S. Effect of follicular growth wave synchronization and treatment with bST or eCG in the OPU-IVP of Nelore, Brangus and Holstein donors. **Anim Reprod**, v. 9, p. 563, 2012.

MELLO, R.R.C., FERREIRA, J.E., SOUSA, S.L.G., MELLO, M.R.B., PALHANO, H.B. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões in vitro (PIVE). **Rev Bras Reprod Anim**, v.40, p.51-57, 2016.

MERTON, J. S., de Roos, A.P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L., Dieleman, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-74, 2003.

MIYAMOTO, A., SHIRASUNA, K., SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domest Anim Endocrinol**, v.37, p. 159–69, 2009.

MOREIRA, F., RISCO, C., PIRES, M.F. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, v.53, p.1305-19, 2000.

MURPHY, B.D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Anim Reprod**, v.9, p.223-30, 2012.

NASSER, L. F., ADAMS, G.P., BO, G.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713-24, 1993.

ONGARATTO, F. L., RODRIGUES-VILLAMIL, P., TRIBULO, A., BÓ, G.A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Anim Reprod**, v. 12, p. 876-83, 2015.

PELLATT, L., RICE, S., DILAVER, N., HESHRI, A., GALEA, R., BRINCAT, M., BROWN, K., SIMPSON, E.R., MASON, H.D. AntiMullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. **Fertil Steril**, v.96, p.1246-51, 2011.

PERRY, G. **2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals**. IETS. Versailles, France: Embryo Transfer Newsletter, v.34, 8 p. 2014.

PONTES, J. H., MELO STERZA, F.A., BASSO, A.C., FERREIRA, C.R., SANCHES, B.V., RUBIN, K.C., SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-6, 2011.

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

RICO, C., MÉDIGUE, C., FABRE, S., JARRIER, P., BONTOUX, M., CLÉMENT, F., MONNIAUX, D. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Bio Reprod**, v.84, p.560-71, 2011.

ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-65, 1998.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis—a symposium in perspective. **Rev Reprod**, v. 1, p.19–27, 1996.

RUBIN, K.C.P., MAX, M.C., PONTES, J.H.F. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça Nelore. **Acta Sci Vet**, v.33, p.372, 2005.

SALES, J.N., IGUMA, L.T., BATISTA, R.I., QUINTÃO, C.C., GAMA, M.A., FREITAS, C., PEREIRA, M.M., CAMARGO, L.S., VIANA, J.H., SOUZA, J.C., BARUSELLI, P.S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **J Dairy Sci**, v. 9, p.3086-99, 2015.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. **Arq Fac Vet**, v. 26, p. 141-45, 1998.

SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., OLIVEIRA, J. A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Anim Reprod Sci**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M. ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p.101-10, 2002.

SENEDA, M. M., BORDIGNON, V. New concepts on folliculogenesis. **Acta Sci Vet**, v. 35, p. 863-68, 2007.

SENDAG, S., CETIN, Y., ALAN, M., HADELER, K.G., NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Anim Reprod Sci**, v. 106, p. 208-14, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C., MARINHO, L.S.R., SANTOS, G.M.G., MACHADO, F.Z., GONZALEZ, S.M., LISBOA, L.A., SENEDA, M.M. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. **Anim Reprod**, v.10, p.180-6, 2013.

SILVA, A.P.T.B., MELLO, R.R.C., FERREIRA, J.E., MELLO, M.R.B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção in vitro de embriões bovinos. **B Industr Anim**, v.72, p.51-8, 2015.

SINGH, J., DOMÍNGUEZ, M., JAISWAL, R., ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 227-43, 2004.

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



SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reprod. Domest. Anim.** v.47, p.148-55, 2012.

SONNEWEND, F., ANDRADE, J.P.N., REZENDE, R.A., BORGES, A.N., SILVA, A.L., MELLO, M.R.B. Impact of injectable P4 and eCG protocol before OPU on in vitro production of bovine embryos. **Anim. Reprod.** v.13, p.472, 2016.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Anim Reprod**, v. 3, p.147-60, 2005.

SUNDERLAND, S.J., CROWE, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 101, p.547-55, 1994.

TAMASSIA, M., HEYMAN, Y., LAVERGNE, Y., RICHARD, C., GELIN, V., RENARD, J.P., CHASTANT-MAILLARD, S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. **Reproduction**, v.126, p. 629-37, 2003.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S., PIRES, M.F.A, DE SÁ, W.F., FERREIRA, A.D.M., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., RAMOS, A.A., FOLHADELLA, I.M., POLISSENI, J., DE FREITAS, C., CLEMENTE, C.A.A., SÁ FILHO, M.F., PAULA-LOPES, F.F., BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-66, 2008.

VAN DEN HURK, R., ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.1717-51, 2005.

VASCONCELOS, J.L.M., SANGSRITAVONG, S., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v.60, p. 795-807, 2003.

VASSENA, R., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J., PIERSON, R.A., SING, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.76, p. 25-41, 2003.

VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões no Brasil: uma nova realidade. **Acta Sci Vet**, v. 3, p. 915-24, 2007.

XU, Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol Reprod**, v.53, p.951-57, 1995.