

ASSOCIAÇÃO DA MOET E OPU-PIV NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

CALIÊ CASTILHO,¹ ANDRÉA RENESTO,² FÁBIO CÂMARA MUSTAFÁ,³ JOSÉ OTÁVIO FOLINO SILVA,³
LIA DE ALENCAR COELHO² E JOAQUIM MANSANO GARCIA²

1. Faculdade de Ciências Agrárias, Mestrado em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: calie@unoeste.br

2. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP

3. Médico veterinário, área: Reprodução de Bovinos.

RESUMO

Objetivou-se avaliar, em vacas da raça Nelore, a associação das biotécnicas MOET e OPU-PIV. Para tanto, foram testadas a superovulação ovariana (SOV), iniciada 48 a 60 horas após a aspiração folicular, em fase aleatória do ciclo estral (OPU1), e a produção *in vitro* (PIV) de embriões de oócitos aspirados (OPU2) em diferentes momentos após a aplicação de prostaglandina F₂α (PGF2α). As fêmeas (n=23), após a OPU1, receberam implante de progestágeno, e 48 a 60 horas após a OPU iniciou-se a SOV convencional, acrescida da aplicação de 25 mg de LH exógeno para realizar a IA (inseminação artificial) com tempo fixo. No dia da colheita dos embriões, os animais foram separados para testar seis tratamentos, sendo os grupos T(0-144) (n=4), T(48-120) (n=5), T(48-96) (n=4), T(72-96) (n=3), T(96-72) (n=4),

T(96-48) (n=3), que variaram de acordo com os momentos da administração de prostaglandina e da OPU2 após a SOV. Aplicou-se prostaglandina no dia da colheita (dia 0) 0, 48, 72 e 96 horas após, realizando-se a OPU2 144, 96, 72 ou 48 horas após a prostaglandina. Houve diferença (p<0,05) no número de oócitos recuperados, sendo que a recuperação no T(96-48) foi (p<0,05) menor, comparada ao T(48-96) e T(72-96); a OPU próxima da prostaglandina (48 h após) prejudicou a recuperação de oócitos. Concluiu-se que é possível realizar a associação das biotécnicas sem prejudicar os índices de produção, desde que a OPU ocorra após a lise dos CLs presentes nos ovários após a superestimulação, ou seja, a partir de 96 horas após a aplicação de PGF2α, depois, portanto, da colheita de embriões *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVES: Aspiração folicular, oócito, embrião, MOET, oócito, Nelore.

ABSTRACT

ASSOCIATION OF THE MOET AND OPU-PIV IN THE PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

It has been the aim to value, in Nelore cows, the association of the assisted reproduction MOET e OPU-PIV. For this, it has tested the ovarian superovulation (SOV) 48 to 60 h after the OPU (ovum pick-up) at a random phase of the estral cycle (OPU1) and the *in vitro* production (PIV) of recovered oocytes embryos (OPU2) in different moments after the prostaglandin F₂α (PGF2α) application. The females (n=23) after the OPU1 received progestogen implant and 48 to 60 h after the OPU, then it has began the SOV, with FSH 180 mg / cows in 8 doses, for 4 days. In 6th and 7th applications of FSH, there were administered 500 µg of PGF2α being the implants withdrawn in the 7th

dose. After 12 h of the SOV, it was applied 25mg of LH to realize AI (artificial insemination) with fixed time. In the day of the embryos recovery 6 treatments were tested: T (0-144) (n=4), T (48-120) (n=5), T (48-96) (n=4), T (72-96) (n=3), T (96-72) (n=4), T (96-48) (n=3) which varied in accordance with moments of the PGF2α administration and of OPU2 after the SOV. The PGF2α administration in the embryo recovery (day 0) 0, 48, 72 and 96 h after the harvest and the OPU2 was 144, 96, 72 or 48 hours after the PGF2α. There was significant difference (p> 0,05) in the oocyte number when the near OPU of the PGF2α was recovered, so that the recuperation in T (96-48) was significantly

less when (48-96) was compared to T and T (72-96), (48 h after) damaged the oocyte recovery. We can conclude that is possible to carry out the association of the assisted reproduction without damaging the rates of production.

Since the OPU takes place after lise of the present CLs in the ovaries after the superstimulation, in other words from 96 hours after the application of prostaglandin, after harvest of embryos *in vivo*.

KEY WORDS: Embryo, MOET, Nelore, oocyte, ovum pick-up.

INTRODUÇÃO

Com o surgimento de duas biotécnicas utilizadas na reprodução de fêmeas – a MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*), junto com a criopreservação de embriões na década de 1980, a OPU-PIV (*Ovum Pick-up*) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões no início da década de 1990 –, houve um crescimento da expectativa no incremento da produtividade das fêmeas. No entanto, embora se trate de técnicas amplamente estudadas e utilizadas, elas ainda apresentam alguns inconvenientes. No caso da MOET, a necessidade de iniciar a superovulação (SOV) em momento determinado do ciclo estral mostra pouca consistência na produção de embriões viáveis pelas doadoras e indução de patologias reprodutivas depois de repetidos tratamentos superovulatórios (GALLI et al., 2003).

A resposta ovariana à superovulação depende do número de folículos presentes nos ovários sensíveis a gonadotrofinas e do estágio da onda folicular no momento em que a aplicação de FSH é iniciada (DRIANCOURT, 2001). Segundo GUILBAULT et al. (1991), o início de tratamentos com gonadotrofinas na presença de um folículo dominante (FD) ou após a seleção deste resulta em resposta superovulatória reduzida. GRADELA et al. (2000) avaliaram a resposta da SOV iniciada com ou sem FD e FD aspirado e observaram que o número de embriões não diferiu entre os grupos, mas a taxa de viabilidade embrionária foi maior nos grupos sem FD (69,4%) e FD aspirado (68,99%), quando comparados ao grupo com FD presente (48,54%).

A OPU-PIV, por sua vez, pode contribuir como uma alternativa para a superovulação e maior produção de embriões por unidade de tempo. NIBART et al. (1995) demonstraram que se pode obter até dezoito gestações em três meses

utilizando-se a OPU, enquanto que com a TE clássica, no mesmo período, seria possível obter apenas cinco gestações. Entretanto, as taxas de blastocistos bovinos oriundos de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* têm permanecido baixas. Em torno, apenas, de um terço (LONERGAN et al., 1994), 15% a 20% (HENDRIKSEN et al., 2000) ou 35% (DAYAN, 2001) dos oócitos selecionados morfológicamente antes de serem submetidos a MIV resultam em embriões viáveis. PEIXER et al. (1995) citam que, além dos baixos índices de blastocistos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações, tais como qualidade biológica dos embriões, dificuldades na criopreservação destes e de oócitos, menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e custo, superior ao embrião produzido pela transferência de embriões (TE).

Com o intuito de associar as biotécnicas MOET e OPU-FIV, o presente trabalho visou avaliar a produção de embriões *in vivo* após superovulação (SOV) 48 a 60 horas após a OPU, em fase aleatória do ciclo estral, e a produção de embriões *in vitro* de oócitos aspirados, após a colheita de embriões, em diferentes momentos após a aplicação de PGF2 α .

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 23 fêmeas adultas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), entre quatro a nove anos, pesando em média 500 Kg, mantidas em pasto de *Brachiaria decumbens*, com acesso à água e sal mineral *ad libitum*. As fêmeas estavam em condições sanitárias e reprodutivas e todas haviam parido em média 7,5 meses antes do início dos experimentos. Inicialmente foi feita aspiração folicular – aspiração folicular-referência (OPU1) em fase aleatória do ciclo estral (CE) –, seguida

pela inserção de implante de liberação lenta de progestágeno (Crestar® - Intervet, Holanda).

Em torno de 48 a 60 horas após a OPU1 iniciou-se o tratamento de superovulação (SOV) utilizando-se FSH (Folltropin® - Vetrepharm, Canadá) na dose total de 180 mg por vaca, com duração de quatro dias consecutivos, em oito aplicações com doze horas de intervalo. Durante a sexta e sétima doses de FSH, administraram-se, por via IM, 500 µg de PGF2α (cloprostenol sódico, Sincrocio®, Ouro Fino), retirando-se os implantes de progestágeno na sétima dose de FSH.

Aproximadamente doze horas após o término da SOV, as fêmeas receberam 25 mg de LH exógeno via IM (Lutropin-V®, Vetrepharm, Canadá) para induzir ovulação e permitir a IA com tempo fixo. Efetuaram-se duas inseminações com intervalo de doze horas, sendo doze e 24 horas após a aplicação do LH. No dia da colheita dos embriões, dividiram-se as fêmeas em seis tratamentos que variaram de acordo com o momento da aplicação de PGF2α após a colheita de embrião (Dia 0) e a aspiração folicular (OPU2) realizada após a SOV. Foram os seguintes os tratamentos realizados: T (0-144) – PGF2α imediatamente após a colheita de embriões e OPU144h após PGF2α (n=4); T (48-120) – PGF2α 48 horas após a colheita de embriões e OPU 120 horas após PGF2α (n=5); T (48-96) – PGF2α 48 horas após a colheita de embriões e OPU 96 horas após PGF2α (n=4); T (72-96) – PGF2α 72 horas após a colheita de embriões e OPU 96 horas após PGF2α (n=3); T (96-72) – PGF2α 96 horas após a colheita de embriões e OPU 72 horas após PGF2α (n=4); T (96-48) – PGF2α 96 horas após a colheita de embriões e OPU 48 horas após PGF2α (n=3).

Administrou-se PGF2α em diferentes momentos para avaliar o efeito do intervalo entre a SOV e a aplicação desta na OPU2 e verificar se esta segunda aspiração seria afetada pela prévia superovulação. O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultra-som Aloka SSD-500 (Aloka CO., Tóquio, Japão) com transdutor microconvexo de 5 MHz (UST 974-5) de frequência conectado à guia de biópsia, com agulhas 18 G e linha de aspiração em

tubos de centrífuga de 50 mL, segundo SENEDA et al. (2001).

Classificaram-se os oócitos de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumullus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumullus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo LONERAGAN (1992). Os oócitos viáveis (GI, GII e GIII) foram transportados em criotubos contendo meio de maturação, em banho-maria a 35°C, composto por TCM 199 bicarbonato (GIBCO BRL; Grand Island, NY), suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), 50UI de hCG/mL (Profasi®, Serono, Brasil), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin® - Vetrepharm, Canadá), 1µg/mL de estradiol (estradiol-17β, Sigma Chemical, CO, USA), 2,2µg/mL de piruvato (Sigma Chemical, CO, USA), 70 µg/mL de amicacina em atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂. A maturação oocitária (MIV), a fecundação (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) foram realizados segundo CASTILHO et al. (2007), incubando-se a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

No laboratório os oócitos foram maturados, por 24 horas, em microgotas de 100 µL de meio para esse fim, que consistiu em TCM 199 bicarbonato, suplementado com 10% SFB, 50UI de hCG/mL, 0,5 µg/mL de FSH, 1µg/mL de estradiol, 2,2µg/mL de piruvato, 70 µg/mL de amicacina. Os oócitos maturados foram fecundados em meio de fecundação TALP-FIV e transferidos para microgotas de 100µL de Tyrode modificado (TALP) suplementado com 10 µg/mL de heparina (Sigma Chemical, CO, USA) e 160 µL da solução PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina, Sigma Chemical, CO, USA).

Separou-se o sêmen congelado em gradiente de densidade em Percoll 45% e 90% e ajustou-se a concentração final de modo que resultasse em 100 x 10³ espermatozoides vivos por gota, os quais foram incubados por dezoito e vinte horas. Após esse tempo, cultivaram-se os prováveis zigotos em meio SOFaa (fluido de oviduto sintético), suplementado com aminoácido essencial e não-essencial, acrescido de 2,5% SFB (soro fetal bovino) e 0,5% de BSA (albumina sérica bovina, Sigma Chemical, CO, USA) livre de ácidos graxos.

Sete dias após a primeira IA, os embriões foram colhidos por lavagem uterina, mediante método não-cirúrgico, utilizando-se solução salina fosfatada tamponada (DPBS) (Dulbecco modificado, Embriocare, Cultilab, Brasil), contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C e recuperados em filtro próprio. Os embriões foram rastreados e transferidos para Placa de Petri contendo DPBS enriquecido com 10% de SFB. Posteriormente, avaliou-se o estágio de desenvolvimento do embrião (mórula, blastocisto, blastocisto em expansão e blastocisto eclodido) (LINDNER & WRIGHT Jr., 1983). Quanto à morfologia (formato e integridade da zona pelúcida), classificaram-se em normais, degenerados, não-fertilizados e sem zona pelúcida.

Avaliaram-se os dados referentes à aspiração folicular realizada após a superovulação (OPU2) pelo teste do Qui-Quadrado. Para verificar a diferença nos resultados da OPU2, quando comparados com a OPU1 (referência), utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, mediante o Statistical Analysis System, (SAS, 1989), seguido pelo teste de Duncan, para comparação das médias ao nível de 5% de probabilidade. Neste caso, obtiveram-se as variáveis analisadas (percentual de oócitos viáveis e a taxa de blastocistos) a partir das diferenças relativas aos resultados da OPU2, quando comparados com os resultados da OPU1.

RESULTADOS

Na Tabela 1, pode-se observar que a aspiração folicular, em fase aleatória do ciclo estral (OPU1), em 23 vacas da raça Nelore, resultou na recuperação de 299 oócitos (média de treze por animal), dos quais 223 (74,5%), média de 9,6, foram submetidos à maturação e à fecundação *in vitro*, produzindo 44 blastocistos (19,7%), média de 1,9 por animal. Embora a OPU1 tenha sido realizada em fase aleatória do CE, agruparam-se os dados por tratamento, pois as aspirações OPU1 e OPU2 foram realizadas nos mesmos animais para avaliar a resposta destes, aspirados em fase aleatória, e, posteriormente, em tempo determinado.

Após a aspiração folicular-referência (OPU1), as mesmas fêmeas foram superovuladas para colheita *in vivo* de embriões e aspiradas novamente (OPU2), em diferentes momentos, após aplicação de PGF2 α , após a superovulação. Do total de 252 oócitos recuperados (média de 10,9 por animal), 73,8% ou 186 (média de 8,1 por animal) foram classificados morfologicamente como viáveis e submetidos à maturação e à fecundação *in vitro*, resultando em 17,2% ou 32 blastocistos (média de 1,4 por animal).

O número de oócitos recuperados e a produção de blastocistos (total e %) foram afetados ($P < 0,05$) pelo momento da aplicação de PGF2 α e pela segunda aspiração folicular (OPU2). O percentual de oócitos viáveis mostrou-se menor ($P < 0,05$) no T (96-48) (33,3%), quando se aplicou a PGF2 α 96 horas depois da colheita de embriões. No tratamento T (48-120), a PGF2 α foi administrada 48 horas após a colheita de embriões e 120 horas após a realização da OPU2, obtendo-se o maior percentual de oócitos viáveis entre os tratamentos (89,7%), diferindo dos tratamentos T (0-144), T (48-96) e T (96-48), com 70,7%, 67,2% e 33,3%, respectivamente. Os tratamentos T (72-96) e T (96-72) não diferiram entre si ($P > 0,05$) do tratamento T (48-120) quanto ao número de oócitos viáveis (Tabela 1).

Com relação à taxa de embriões produzidos *in vitro*, o melhor tratamento observado foi o T (0-144), com 48,3% de blastocisto, que diferiu dos tratamentos T (48-120), T (48-96), T (72-96) e T (96-72) e não diferiu ($P > 0,05$) do T (96-48) (Tabela 2). Uma vez que os animais foram submetidos a duas OPUs com um tratamento superovulatório intermediário, fez-se uma comparação da produção *in vitro* entre a OPU1 (referência) e a OPU2, observando-se que a produção de embriões no T (96-48) foi menor ($p < 0,05$) quando comparada aos demais tratamentos, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). A produção *in vivo* de embriões (TE) nas 23 vacas da raça Nelore resultou em 72 embriões (3,1 por animal), dos quais 73,6% ou 53 (2,3 por animal) foram classificados morfologicamente como viáveis e 26,3% ou 19 (3,1 por animal) foram classificados como não-viáveis.

TABELA 1. Total de oócitos recuperados, número e % de oócitos viáveis e número e % de blastocistos obtidos em fase aleatória do ciclo estral na OPU1 e aspiradas em diferentes momentos após a SOV e aplicação de PGF2 α (OPU2) nos tratamentos T (0-144), T (48-120), T (48-96), T (72-96), T (96-72) e T (96-48), nos quais a aplicação de PGF2 α ocorreu no dia da colheita (dia 0) 0 ou 48, 72 e 96 h após e a OPU2 foi realizada 144, 96, 72 ou 48 h após a PGF2 α

*Tratamento	OPU1			OPU2		
	Oócitos totais	Oócitos viáveis	Blastocistos	Oócitos totais	Oócitos viáveis	Blastocistos
T (0 – 144)	38	29 (76,3)	9 (31,0%)	41	29 (70,7%)b	14 (48,3%)a
T (48 – 120)	61	53 (86,9)	1 (1,9%)	58	52 (89,7%)a	6 (11,5%)b
T (48 – 96)	52	32 (61,5)	6 (18,8%)	61	41 (67,2%)bc	6 (14,6%)b
T (72 – 96)	34	23 (67,6)	4 (17,4%)	21	17 (81,0%)ab	2 (11,8%)b
T (97 – 72)	87	62 (71,3)	11 (17,7%)	56	42 (75,0%)ab	3 (7,1%)b
T (96 – 48)	27	24 (88,9)	13 (54,2%)	15	5 (33,3%)c	1 (20,0%) ab
Total	299	223 (74,5%)	44 (19,7%)	252	186 (73,8%)	32 (17,2%)

Letras distintas diferem entre si dentro da coluna ($p < 0,05$).

TABELA 2. Número e média total de embriões recuperados, % e número de embriões viáveis e não-viáveis produzidos *in vivo* após colheita de embriões nos animais dos tratamentos T (0-144), T (48-120), T (48-96), T (72-96), T (96-72) e T (96-48), nos quais a aplicação de PGF2 α ocorreu no dia da colheita (dia 0) 0 ou 48, 72 e 96 h após e a OPU2 foi realizada 144, 96, 72 ou 48 h após a PGF2 α

Tratamento*	n	N $^{\circ}$ total e média de embriões por animal	% Viáveis	% Não-viáveis
T (0 – 144)	4	17 (4,2)	94,1%(16)	5,9% (1)
T (48 – 120)	5	7 (1,4)	14,3%(1)	85,7% (6)
T (48 – 96)	4	12 (3,0)	91,7% (11)	8,3% (1)
T (72 – 96)	3	1 (0,3)	0 (0,0)	100% (1)
T (96 – 72)	4	19 (4,7)	63,2% (12)	36,8% (7)
T (96 – 48)	3	16 (5,3)	81,3% (13)	18,7% (3)
Total	23	72 (3,1)	73,6% (53)	26,3% (19)

* A colheita de embriões foi realizada após a OPU1 e antes da OPU2 nos mesmos grupos de animais.

DISCUSSÃO

A aspiração-referência (OPU1), realizada em fase aleatória do CE, resultou em uma média de 9,6 oócitos viáveis, e na OPU2 a média, independentemente do tratamento, foi de 8,1 oócitos. Quando se agruparam os animais por tratamentos, o percentual de oócitos viáveis variou de 33,3% no T (96-48) a 89,7% no T (48-120). Essas médias obtidas são semelhantes às taxas de recuperação de oócitos observadas por DAYAN (2001), SENEDA et al. (2001) e CASTILHO (2003) – 9,0, 9,2 e 9,7, respectivamente. Com relação à taxa de blastocistos, na OPU2, embora não houvesse diferença,

os tratamentos que resultaram em maior taxa de desenvolvimento embrionária foram o T (0–144), com 48,3%, e T (48-120), com 11,5 % dos oócitos maturados e fecundados atingindo o estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário em todos os tratamentos da OPU2 variou de 7,1% a 48,3% e, na OPU1, excluindo-se o valor de 1,9%, variou de 17,4% a 54,2%, sendo que uma ampla variação também foi observada por KRUIP et al. (1994), 9% a 26%, HASLER et al. (1995), 4% a 33%, e DAYAN (2001), 14% e 54%.

Na produção *in vivo* de embriões iniciada 48 a 60 horas após a OPU, em fase aleatória do CE, obteve-se uma média de 2,3 embriões por animal,

sendo que a média nacional para as doadoras zebuínas (FONSECA et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2000; RODRIGUES, 2001) variou de 2,4 a 9,9 embriões. GRADELA et al. (2000) também não observaram aumento do número de estruturas quando realizaram a SOV na ausência do FD, embora tivessem registrado melhora na viabilidade embrionária. Em análise por tratamentos, obtiveram-se as melhores médias de embriões produzidos *in vivo* nos tratamentos T (0-144) e T (96-48) – 4,0 e 4,3. As taxas intermediárias situam-se nos tratamentos T (48-96) e T (96-72) – 2,7 e 3,0. Houve ausência de produção nos tratamentos T (48-120) e T (72-96). GALLI et al. (2003) confirmam a baixa consistência na produção *in vivo* de embriões, em que um terço das doadoras tratadas não responde a SOV, um terço produz em média três embriões e somente um terço restante resulta em grande número de embriões transferidos.

Quando se compararam os tratamentos realizados na OPU2, observou-se que a recuperação no T(96-48) – cinco oócitos (33,3%) – foi menor ($p < 0,05$) que os demais tratamentos, demonstrando que o momento da OPU muito próximo à administração de PGF2 α , apenas 48 horas, prejudicou a recuperação dos oócitos. É importante ressaltar que a resposta à SOV foi satisfatória e a presença de muitos CLs nos ovários pode ter dificultado a recuperação dos oócitos na OPU2. Por outro lado, nos tratamentos em que a OPU foi realizada a partir de 96 horas da aplicação de PGF2 α , as taxas de oócitos não variaram, demonstrando que a recuperação e a produção *in vitro* após a SOV são possíveis sem prejudicar os índices de produção.

Além da diminuição na recuperação dos oócitos em função da presença de vários CLs nos ovários, outro fator que pode ter afetado diretamente essa recuperação é a ausência da emergência da onda folicular até 48 horas após a colheita de embriões. Segundo ADAMS et al. (1992) e GIBBONS et al. (1999), em torno de 24 a 36 horas após a ovulação ocorre o crescimento de um grupo de folículos que é caracterizado como a emergência da onda folicular no CE normal. No entanto, não existem na literatura trabalhos que demonstrem o tempo de emergência da onda folicular após superovulação.

Ressalve-se que, no presente estudo, até 48 horas após a PGF2 α não houve emergência da onda folicular, o que, provavelmente, ocorreu mais tarde em animais superovulados, pois acima de 72 horas registrou-se aumento no percentual de oócitos recuperados e acima de 96 horas não houve comprometimento da taxa de oócitos recuperados e produção de blastocistos. Convém assinalar que assim como no T (0-144) se obteve a maior taxa de blastocistos produzidos *in vitro*, também se observou a maior taxa de blastocistos produzidos *in vivo*, demonstrando que a SOV, além de não ter prejudicado a recuperação na OPU2, ainda gerou bom índice na produção de embriões *in vivo*.

CONCLUSÕES

A recuperação de oócitos e a taxa de blastocistos das aspirações não variaram entre a OPU1 e OPU2, o que permite concluir que é possível realizar a alternância das biotecnologias sem prejudicar os índices de produção. Isso, entretanto, desde que a OPU ocorra após a lise dos CLs resultantes da superovulação, ou seja, a partir de 96 horas após a aplicação de PGF2 α , depois, portanto, da colheita de embriões *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

À Agropecuária J. Garcia na pessoa de Gilmar Garcia, por ceder parte dos animais usados nos experimentos e à Fapesp pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 94, p.177-188, 1992.

CASTILHO, C. **Divergência no crescimento folicular em novilhas da raça nelore e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário *in vitro***. 86 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

- CASTILHO, C.; ASSIS, G.S.; GARCIA, J.M. Influence of diameter and follicular fase on the *in vitro* competence of oocytes from Nelore heifers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 288-294, 2007.
- DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. 2001, 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- DRIANCOURT, M. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animal. implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p.1211-1231, 2001.
- FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; BELISÁRIO, H.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T. Different embryonic stages recovered from zebu donors. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 263 (Abstr), 2000.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; GROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p.599-616, 2003.
- GIBBONS, J.; WILBANK, M.; GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulation hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 60, p.72-77, 1999.
- GRADELA, A.; ESPER, C.R.; MATOS, S.P.M.; LANZA, J.A.; DERAGON, L.A.G.; MALHEIROS, R.M. Dominant follicle by ultrasound guided transvaginal aspiration and superovulatory response in Nelore cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 53-58, 2000.
- GUILBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 81-89, 1991.
- HASLER, J.F.; HENDRERSON, W.B.; HURTGEM, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p.141-152, 1995.
- HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS P.L.; STEENWEG W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p.11-20, 2000.
- KRUIP, T.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.
- LINDNER, G.M.; WRIGHT, E.W. Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-416, 1983.
- LONERGAN, P. **Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**. 1992. PHD (Thesis) – National University of Ireland, Dublin, 1992
- LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.
- NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J.M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A.E.T.E., 11., Hannover, **Proceedings...** Hannover, 1995. 216 p.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; ANDREUSSI, P.A.T.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated Nelore cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 503 (Abstr.), 2000.
- PEIXER M.A.S.; SOUZA R.V.; RUMPF R.; DE BEM A.R.; NETO M.A.P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no CENARGEN. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 32, p. 49 (Abstr.), 1995.
- RODRIGUES, J.L. Transferência de embriões bovinos: histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p.102-107, 2001.
- SAS. Statistical Analysis System (1989). **SAS/STAT User's Guide, Release 6.12**. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; DE OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.