

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MARCUS DANTAS DÓREA

**FOLÍCULOS RESIDUAIS SUBSEQUENTES À ASPIRAÇÃO
FOLICULAR EM BOVINOS**

ALEGRE – ES

2012

MARCUS DANTAS DÓREA

**FOLÍCULOS RESIDUAIS SUBSEQUENTES À ASPIRAÇÃO
FOLICULAR EM BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

ALEGRE – ES

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

D695f Dórea, Marcus Dantas, 1984-
Folículos residuais subsequentes à aspiração folicular em bovinos /
Marcus Dantas Dórea. – 2012.
64 f. : il.

Orientador: João Henrique Moreira Viana.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Reprodução animal – Aspectos endócrinos. 2. Vaca. 3. Ovários. 4.
Ultrassonografia. 5. Dinâmica. 6. Folículo. I. Viana, João Henrique
Moreira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias. III. Título.

CDU: 619

MARCUS DANTAS DÓREA

FOLÍCULOS RESIDUAIS SUBSEQUENTES À ASPIRAÇÃO
FOLICULAR EM BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução.

Aprovada em 30 de março de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
EMBRAPA Gado de Leite
Orientador

Prof^a. Dr^a. Jeanne Broch Siqueira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
EMBRAPA Gado de Leite

Dedico este trabalho à minha família, alicerce de tudo que construí em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha querida família, razão de minha existência e de meus esforços.

À minha mãe Célia Rosângela Dantas Dórea e ao meu pai Valfredo Ribeiro Dórea, por terem me ensinado os valores éticos e morais, e por terem sido exemplo de perseverança, honestidade e de coragem.

À minha noiva Patrícia Gusmão Guimarães Giuriato, por todo apoio, amor, carinho, paciência e pelo incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA – Gado de Leite), por fornecer toda estrutura necessária para a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana, pela dedicação, compreensão e profissionalismo com que executou o papel de orientador.

À Prof^a. Dr^a. Jeanne Broch Siqueira, por participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Miller Pereira Palhão, por participar da banca examinadora e contribuir com este trabalho, com seus conselhos, dicas, ajuda e palavras de incentivo e amizade.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do CCA – UFES.

Ao Médico Veterinário Me. Agostinho Jorge dos Reis Camargo e Dra. Raquel Varella Serapião, pelos ensinamentos, contribuição com os experimentos e, acima de tudo, pela amizade, incentivo e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Ao técnico da Embrapa Gado de Leite Gilmar Pereira Alvim (Del), pelos conselhos, amizade, dedicação e ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e residentes técnicos agrícolas da Embrapa Gado de Leite, que não mediram esforços para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo companheirismo.

Ao Dirlei, amigo e professor do Curso de Graduação, que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

À Louisiane, amiga e professora, que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional durante o Curso de Graduação.

À FAPES pela bolsa de estudo concedida.

E também, aos que não foram citados nominalmente, mas que, colaboraram em algum aspecto, para a finalização de minha dissertação.

A todos, gostaria de homenageá-los através de uma singela, mas profunda palavra: Gratidão!

Muito obrigado a todos!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de folículos residuais pós-aspiração de folículos ovarianos de 8 e 12 mm de diâmetro, por meio da avaliação dos fatores endócrinos, analisando a interferência destas estruturas no desenvolvimento normal da dinâmica de crescimento. Foram selecionadas vacas da raça Holandesa (N=13) não lactantes e com dois ciclos estrais normais consecutivos; estas foram tratadas com 500mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) e 3 mg de norgestomet (Crestar®) (D0), 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) (D1), após a emergência da onda folicular foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos caracterizados pela ausência ou presença de implantes de norgestomet, cada tratamento dividido em dois grupos: presença do implante e folículo de 8 mm (G1), ausência do implante e folículo de 8 mm (G2), presença do implante e folículo de 12 mm (G3) e ausência do implante e folículo de 12 mm (G4). O monitoramento ultrassonográfico (Esaote Pie Medical®) foi realizado duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas. Os folículos ovarianos foram aspirados com 8 e 12mm e avaliados quanto à presença do resíduo ao processo de aspiração, quando residual, eram aspirados novamente. Os dados de dinâmica de crescimento folicular, perfil hormonal do plasma sanguíneo e do fluído folicular foram verificados quanto à distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk e comparadas nos diferentes tratamentos pelo teste t de student. Os dados de perfil de esteroidogênico dos folículos aspirados em diferentes diâmetros foram analisados pelo SAS GLM procedure para o principal efeito de tratamento e as comparações foram feitas pelo teste F. O nível de significância adotado foi de 5%. O tratamento com progestágeno não afetou o crescimento folicular. A taxa de folículo residual foi de 74.6%. O tratamento com progestágeno não afetou ($P>0.05$) o percentual de folículos residuais, independente do diâmetro do folículo, no entanto, o efeito do diâmetro folicular aproximou a significância estatística ($P=0.07$). Os folículos residuais cresceram cerca de 5 mm ao dia. Dos folículos residuais aproximadamente 65% se tornaram folículos ativos, 12% folículos luteinizados e 23% folículos inativos. Conclui-se que a presença de folículos residuais ocorre na maioria dos folículos aspirados com maior frequência em 12 mm e grande parte ativos e com elevada concentração de estradiol.

Palavras-chave: esteroidogênese, *ovum pick-up*, produção *in vitro* de embriões, dinâmica folicular, vaca

ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the follicular persistence rate of ovarian follicles of 8 and 12 mm in diameter post-aspiration, through the evaluation of endocrine factors, analyzing the interference of these structures in the normal development of the dynamic growth. Holstein cows (N=13) non-lactating and with two consecutive normal estrous cycles were selected; they were treated with 500 mg of sodium cloprostenol (Sincrocio®) and 3 mg of norgestomet (Crestar®) (D0), 2 mg of estradiol benzoate (Sincrodiol®) (D1), randomly assigned to two treatments characterized by the absence or the presence of norgestomet implants, which were subdivided into four groups: presence of the implant and follicle of 8 mm (G1), absence of the implant and follicle of 8 mm (G2), presence of the implant and follicle of 12 mm (G3) and absence of the implant and follicle of 12 mm (G4). Ultrasound monitoring (Esaote Pie Medical®) was performed twice daily with an interval of 12 hours. The ovarian follicles were aspirated with 12 and 8 mm and evaluated for its persistence to the process of aspiration, when persistent these were aspirated again. The data on dynamics of follicle growth, hormone profile of the blood plasma and follicular fluid were checked for normal distribution, by Shapiro-Wilk test, and compared in different treatments by the student's t test. The steroidogenic profile data of the follicles aspirated at different diameters were analyzed by SAS GLM procedure for the main effect of treatment and the comparisons were made by the F test. The significance level adopted was 5%. Treatment with progesterone did not affect follicular growth. The persistence rate was 74.6%. Treatment with progesterone did not affect ($P>0.05$) the percentage of residual follicles, independent of the diameter of the follicle, however, the effect of the follicular diameter approached the statistical significance ($P=0.07$). The residual follicles grow approximately 5 mm per day. Of the residual follicles approximately 65% became active follicles, 12% luteinized follicles and 23% inactive follicles. It was concluded that the follicular persistence occurs in the majority of the follicles more frequently aspirated with 12 mm and most of the residual follicles were active and with high estradiol concentration.

Keywords: Steroidogenesis, *Ovum pick-up*, *In vitro* production of embryos, follicular dynamics, Cow

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Desenvolvimento folicular antes da aspiração do folículo dominante em cada um dos grupos estudados. Folículo dominante aspirado aproximadamente aos 8 mm de diâmetro: Tratado (G1) ou não com progestágeno (G2). Folículo dominante aspirado aproximadamente aos 12 mm de diâmetro: Tratado (G3) ou não com progestágeno (G4). Setas indicam o momento da aspiração folicular..... 41
- Figura 2 – Seqüência de imagens ultrassonográficas do folículo residual com 12, 24, 36 e 48 horas após aspiração do folículo de 8 mm... 45
- Figura 3 – Seqüência de imagens ultrassonográficas do folículo residual com 12, 24, 36 e 48 horas após aspiração do folículo de 12 mm. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência de folículos residuais após a aspiração do folículo dominante em diferentes estádios de desenvolvimento provenientes de vacas Holandesas tratadas ou não com progestágeno.....	42
Tabela 2 – Perfil esteroidogênico dos folículos aspirados em diferentes diâmetros e tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4).....	43
Tabela 3 – Perfil esteroidogênico dos folículos que se tornaram (Sim) ou não residuais após a aspiração em diferentes diâmetros e, tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4).....	43
Tabela 4 – Perfil esteroidogênico dos folículos residuais formados após a aspiração em diferentes diâmetros e tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4).....	44
Tabela 5 – Diferenças médias no diâmetro e perfil esteroidogênico entre os folículos aspirados em cada um dos grupos e seu correspondente residual.....	46
Tabela 6 – Características dos folículos residuais em função do perfil esteroidogênico.....	48
Tabela 7 – Perfil esteroidogênico dos folículos que, após a aspiração, resultaram na formação das diferentes categorias de folículos residuais.....	49

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

- TE – Transferência de embriões.
- PIVE – Produção *in vitro* de embriões.
- FSH – Hormônio folículo estimulante.
- LH – Hormônio luteinizante.
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina.
- mm – Milímetros.
- Hg – Mercúrio.
- MHz – Megahertz.
- E2 – Estradiol
- P4 – Progesterona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ESTEROIDOGÊNESE E CONTROLE ENDÓCRINO DO CRESCIMENTO FOLICULAR	17
2.1.1	Fases do crescimento folicular	17
2.1.2	Papel dos hormônios folículo estimulante e luteinizante.....	19
2.1.3	Estrutura do folículo	21
2.1.4	Características dos folículos nas fases pré e pós divergência	21
2.2	CONTROLE EXÓGENO DA DINÂMICA FOLICULAR	23
2.2.1	Importância do controle da dinâmica nos processos de sincronização de cio	23
2.2.2	Estratégias para sincronização da onda	23
2.2.2.1	AGONISTAS DE HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA..	24
2.2.2.2	BENZOATO DE ESTRADIOL	25
2.3	ASPIRAÇÃO FOLICULAR	26
2.3.1	Objetivos da aspiração folicular	26
2.3.2	Caracterização da Técnica da Aspiração Folicular	26
2.3.3	Uso da aspiração folicular na sincronização	38
	CAPÍTULO 1	30
3	Cap. 1 – Folículos residuais subsequentes à aspiração folicular em bovinos	31
3.1	RESUMO.....	31
3.2	ABSTRACT	33
3.3	INTRODUÇÃO	34
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.4.1	Localidade	36
3.4.2	Delineamento experimental	36
3.4.3	Procedimentos experimentais	37

3.4.4	Análises estatísticas	39
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.5.1	Crescimento folicular	40
3.5.2	Percentual de folículo residual após a aspiração do conteúdo folicular e perfil hormonal dos folículos residuais	41
3.5.3	Estudo dos folículos normais e residuais de acordo com o perfil da atividade esteroidogênica	47
3.6	CONCLUSÕES	50
3.7	REFERÊNCIAS	51
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
5	REFERÊNCIAS GERAIS	54

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a pecuária bovina se caracteriza pelo sistema extensivo de produção a pasto e pelo grande número de animais. O rebanho conta com 169,9 milhões de cabeça que ocupam 170 milhões de hectares (IBGE, 2006). Segundo Rodrigues e Rodrigues (2000), para o aumento dos índices reprodutivos e zootécnicos a pecuária brasileira vem passando por um processo de tecnificação, onde grande parte do rebanho faz uso de alguma tecnologia como melhoramento da utilização de pastagem, alimentação intensiva, avaliação e seleção genética, manejo sanitário, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fertilização *in vitro* (FIV).

Na classificação mundial, o Brasil é o país que possui maior número de embriões bovinos produzidos *in vitro*. No país a produção *in vitro* de embriões (PIVE) até o fim dos anos 90 não era comercialmente expandida, utilizava-se rotineiramente apenas em laboratórios de pesquisa. No decorrer de cinco anos houve um avanço na utilização de PIVE em bovinos, e o Brasil passou a ser referência e o maior produtor mundial. Esta produção, até meados de 2003 mostrava-se em alta, mesmo ocorrendo variações, e após o ano de 2004, passou a ser a técnica mais utilizada em raças zebuínas para a produção de embriões. Com isso houve aumento no mercado nacional de embriões, que passou a produzir mais de 200.000 embriões/ano (VIANA et al., 2010).

Entre os anos de 2005 a 2009 a produção total de embriões apresentou uma tendência de estabilização, isso devido ao aumento no uso da PIVE e redução na utilização da TE. Verificou-se em 2008 que o percentual de embriões produzidos *in vitro* no Brasil, ultrapassou a metade do total de embriões produzidos no mundo, diferindo da produção de embriões *in vivo* que após 2003-2004 sofreu redução (VIANA et al., 2010).

Os principais desafios de hoje, em termos operacionais, estão relacionados às questões de maximizar eficiência, agregar outras biotécnicas e evitar oscilações nos resultados (SENEDA & BLASCHI, 2004). Neste sentido, Viana et al. (2001) observaram que a punção e aspiração folicular podem não induzir a regressão de folículos dominantes (com produção ativa de esteróides), sendo que estes folículos apresentam um rápido reenchimento de seu conteúdo pré-aspirado, recuperação

do crescimento folicular e possível retomada do processo esteroidogênico. A presença destes folículos residuais ao processo de aspiração pode comprometer a dinâmica de desenvolvimento folicular ovariana e prejudicar os resultados de coletas posteriores.

Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de folículos residuais pós-aspiração de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento, verificar fatores endócrinos (locais e sistêmicos) envolvidos nesse processo e investigar a interferência destas estruturas no desenvolvimento normal da dinâmica de crescimento e renovação folicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTEROIDOGÊNESE E CONTROLE ENDÓCRINO DO CRESCIMENTO FOLICULAR

2.1.1 Fases do crescimento folicular

A foliculogênese na espécie bovina é um processo complexo que se caracteriza pela formação e crescimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios. É um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos e tem início na vida fetal, permanecendo na puberdade e durante toda vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001). Este mecanismo pode ser dividido em duas fases, pré-antral e antral. A ativação dos folículos primordiais e o crescimento para os estágios de folículos primários e secundários ocorrem na fase pré-antral. O início da fase antral ocorre quando há o surgimento dos folículos terciários e se encerra quando se forma o folículo pré-ovulatório ou folículo *De Graaf* (IRELAND, 1987; SAUMANDE, 1991; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Em bovinos, no período de 120 a 140 dias de vida embrionária, ocorre a formação dos folículos primordiais, estes são compostos por uma camada de células somáticas planas (células da pré-granulosa), originadas do epitélio celômico que circundam os oócitos (RÜSSE, 1983; WANDJI et al., 1992). Em seguida ocorre o período de quiescência, onde as células da pré-granulosa cessam a multiplicação e entram em um período de repouso. Quando o folículo em quiescência retorna seu crescimento, dias, meses ou anos depois de sua formação, a proliferação celular é retomada, transformando os folículos em primários e secundários até os estágios de folículos antral e pré ovulatórios (HIRSHFIELD, 1991).

Nos mamíferos, ao nascimento, os ovários são compostos por milhares de folículos primordiais, estes designados como o *pool* de reserva dos folículos ovarianos. No entanto, destes folículos apenas 0,1% conseguem chegar à ovulação, pois a maior parte sofre o processo de atresia folicular (MARSTRÖM et al., 2002).

A saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento é a primeira e fundamental etapa de desenvolvimento, pois os folículos passam do estágio de repouso para o início do crescimento. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo controle deste processo ainda não estão muito

esclarecidos (FORTUNE et al., 2000; MARTINS et al., 2008). Em mamíferos, tanto os hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como os fatores de crescimento são responsáveis pelo crescimento contínuo de folículos, sendo que os fatores de crescimento agem de forma direta ou indireta e de maneira autócrina ou parácrina (MARTINS et al., 2008).

Devido à vascularização pouco desenvolvida, há indícios de que os fatores autócrinos e parácrinos têm maior importância que os endócrinos no controle do crescimento em folículos pré antrais e pequenos folículos antrais (MONNIAUX et al., 1997).

Gong et al. (1996) demonstraram que o estágio pré-antral da foliculogênese é predominantemente regulado por fatores intraovarianos já que o crescimento de folículos antrais iniciais, até aproximadamente 4 mm de diâmetro, ocorre na ausência de hormônio folículo estimulante (FSH). Entretanto, existem relatos da presença de receptores de hormônio folículo estimulante (FSHR) em folículos primários de bovinos, observando-se ainda crescimento de folículo pré-antral após a adição em meio de cultura de FSH, considerando-o como coadjuvante no controle do estágio pré-antral (XU et al., 1995; McNATTY et al., 1999; GUTIERREZ et al., 2000; WEBB et al., 2003).

Fatores produzidos localmente conduzem predominantemente o início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral (McNATTY et al., 1999). O oócito tem um papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (GILCHRIST et al., 2004).

A forma de comunicação entre o oócito e as células somáticas ocorre por sinalização parácrina. Vários fatores de crescimento são produzidos pelo oócito e células da granulosa, entretanto, alguns têm despertado maior atenção recentemente, dentre eles o fator de células tronco (SCF) e membros da família dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β), particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9 β). Através de mecanismos endócrinos, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) também parece contribuir para a regulação do crescimento folicular pré-antral (BURATINI, 2006), além de outros fatores como ativina, folistatina, inibina, fator de crescimento (EGF) e fator de crescimento fibroblásticos (FGFs) (McNATTY et al., 1999).

Na fase antral de desenvolvimento folicular o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares, são induzidos pelas gonadotrofinas (FORTUNE et al., 2001). Segundo Webb et al. (2003) e Fortune et al. (2004), peptídeos sintetizados localmente desempenham importante papel na regulação da fase antral, por meio de mecanismos parácrinos ou endócrinos.

Uma onda de crescimento folicular caracteriza-se por pequenos folículos recrutados e que iniciam uma fase de crescimento, por cerca de três dias, denominando-se fase de emergência folicular (GINTHER et al., 2003). Apenas um destes folículos segue seu desenvolvimento tornando-se folículo dominante, os folículos restantes, decrescem e se tornam folículos subordinados, caracterizando a divergência folicular (LUCY et al. 1992).

Os folículos subordinados sofrem degeneração em um processo conhecido como atresia folicular, enquanto que apenas uma minoria vai completar sua maturação e ovular (GONSALVES et al., 2002). Quanto ao folículo dominante, este cresce aproximadamente por cerca de seis dias até chegar ao diâmetro máximo, permanecendo estático por dias, com regressão ou ovulação, quando folículo dominante da última onda (GINTHER et al., 1989).

O folículo dominante tem papel fundamental, através da secreção de estradiol e inibina, na supressão do crescimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 1996). Em bovinos mesmo sem a ação do hormônio luteinizante (LH), os folículos chegam a atingir 8mm de diâmetro, contudo, para atingir diâmetros acima de 9mm é preciso que haja LH endógeno ou FSH exógeno (GONG et al., 1996).

2.1.2 Papel dos hormônios folículo estimulante e luteinizante

As gonadotrofinas desempenham um papel importante no crescimento dos folículos ovarianos (LEVI-SETTI et al., 2004), visto que a regulação da foliculogênese é um processo resultante da ação entre fatores locais e endócrinos (SILVA et al., 2006).

O hipotálamo é uma glândula que se localiza na base do cérebro, responsável pela secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que

por sua vez, estimula a liberação dos hormônios glicoprotéicos, folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Estes hormônios são sintetizados pela hipófise anterior e agem regulando a função ovariana (WU et al., 2000).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré óptica do hipotálamo e sua liberação ocorre sob forma de pulsos (CLARKE, 1988) atingindo posteriormente a adenohipófise por meio do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, desencadeando a secreção das gonadotrofinas FSH e LH. Estes hormônios também são liberados, na circulação sistêmica, de maneira pulsátil atuando nas gônadas através da regulação da gametogênese e secreção dos estrógenos gonadais (STANISLAUS et al., 1998).

A manutenção da função ovariana necessita da ação do hormônio gonadotrófico FSH, tendo sua ação predominantemente direcionada às células da granulosa, resultando em uma variedade de reações, como por exemplo, estimulação da proliferação celular, a síntese de esteróides e a expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e LH (MARTINS, 2008). O FSH tem influência sobre a produção de estrógeno, levando as células da granulosa a converterem andrógenos produzidos pelas células da teca, influenciados pelo LH, em estrógenos (FORTUNE et al., 2004). O FSH pode ainda induzir receptores a mais para FSH, e estimular a formação de receptores pra LH, entretanto, o LH age de maneira contrária, reduzindo o numero de receptores para FSH na granulosa (SATBENFELD & EDQVIST, 1996).

O LH é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior, junto com o FSH sendo um regulador primário da função ovariana e podendo desempenhar múltiplos papéis sobre o desenvolvimento folicular, porém grande parte dos estudos tem focado sua ação em folículos em estádios mais avançados de desenvolvimento, durante a fase pré-ovulatória (WU et al., 2000). O LH é controlado pelo estrógeno e pela progesterona ovarianos e, durante parte do ciclo estral, estes hormônios inibem por retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, a secreção de LH (GOODMAN & KARSCH, 1980).

Níveis tônicos ou basais de LH agem juntamente com o FSH na tentativa de induzir a secreção de estrógenos do folículo ovariano desenvolvido. Quando ocorrer pico préovulatório do LH haverá rompimento da parede do folículo e ovulação (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A utilização isolada do FSH e do LH tem sido capaz de

manter o crescimento folicular *in vitro* (CORTVRINDT et al., 1998). Em um experimento utilizando camundongos, desenvolvido por Wu et al. (2000), foram verificados que para o desenvolvimento *in vitro* de pequenos folículos pré-antrais é necessário haver LH.

Braw-Tal e Roth (2005) relataram presença de receptores para LH na teca interna de folículos pré-antrais, em estádios mais avançados, sendo que estes têm relação direta com a viabilidade folicular, portanto, sua presença reduz progressivamente com a atresia.

2.1.3 Estrutura do folículo

Os folículos primordiais, primários, secundários (pré-antrais) e terciários (antrais) podem ser encontrados em ovários de uma fêmea bovina púbere e caracterizados estruturalmente, respectivamente, por um oócito rodeado por uma camada de células somáticas achatadas (pré-granulosa); uma camada de células cubóides (granulosa) rodeando o oócito; apresentam duas ou mais camadas da granulosa; múltiplas camadas da granulosa formando uma cavidade repleta de fluido folicular e crescimento intenso do oócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2003).

Os folículos antrais, além de células da granulosa organizadas em várias camadas e do oócito, apresentam uma cavidade preenchida pelo fluido folicular, constituído de água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

2.1.4 Características dos folículos nas fases pré e pós divergência

As fases foliculares pré-antral e antral inicial contam principalmente com o suporte de estimuladores locais, demonstrando que os folículos antrais em bovinos crescem até o diâmetro de 4 mm na ausência de FSH e LH. Folículos entre 4 e 8 mm demonstraram dependência ao FSH e independência do LH, e folículos acima de 9 mm só foram encontrados na presença de LH endógeno ou FSH exógeno (GONG et al., 1996). Assim, até a ocorrência de dominância os folículos são

dependentes de FSH, e só então passam a depender do LH para continuar o desenvolvimento (FORTUNE et al., 2001).

Nas espécies monovulatórias somente um dos folículos recrutados no *pool* de reserva continua o crescimento, se tornando dominante, enquanto os demais se tornam subordinados e entram no processo de atresia. O folículo dominante atua ativamente sobre a supressão do crescimento dos subordinados através da secreção de estradiol e inibina (FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 1996).

A diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos com a continuidade do crescimento do maior folículo e decréscimo ou parada no desenvolvimento dos demais é definida como divergência folicular (GINTHER et al., 1996).

O processo de dominância folicular está relacionado com o aparecimento de receptores de LH (LHR) em células da granulosa (XU et al., 1995; BAO & GARVERICK, 1998). Bao e Garverick (1998) observaram através da hibridização *in situ* de folículos recrutados e dominantes os padrões de expressões gênicas, concluindo que o início da expressão para o gene LHR em células da granulosa está associado aos folículos dominantes.

Fortune et al. (2004), relataram que a seleção do folículo dominante possivelmente depende do papel desempenhado pelo sistema IGF e estes são sinérgicos ao FSH no processo de crescimento folicular e produção de estradiol. A expressão gênica do IGF-I e IGF-II foi verificada, respectivamente, em células da granulosa e da teca, contudo, o IGF-II foi apontado como principal IGF intraovariano, enquanto o IGF-I atua de maneira endócrina (ARMSTRONG et al., 1998; YUAN et al., 1998, Webb et al., 2003).

O folículo dominante realiza de forma passiva a queda da concentração do FSH e de forma ativa a redução do número de receptores ao hormônio nos folículos subordinados. Assim, os hormônios produzidos pelas células da granulosa do folículo dominante, estradiol e inibina, diminuem a liberação de FSH, levando-a a concentrações baixas, incapaz de manter o desenvolvimento dos folículos subordinados, entretanto, suficiente para o crescimento do folículo dominante (ALVES et al., 2002).

2.2 CONTROLE EXÓGENO DA DINÂMICA FOLICULAR

2.2.1 Importância do controle da dinâmica nos processos de sincronização de cio

Em fêmeas bovinas o ciclo estral é controlado por uma interação neuroendócrina, regulada pelo eixo hipotálamo, hipófise, ovário, útero e mecanismos intraováricos, que promovem uma dinâmica folicular permitindo o desenvolvimento de um folículo maduro, com a capacidade de ovular no momento oportuno e com isso, produzir uma célula que possa ser fecundada (CALLEJAS, 2001).

Em vacas de corte acíclicas, a utilização de terapias de progestágenos e estrógenos, durante o período pós-parto, pode induzir a manifestação de estro seguido de ovulação e a ativação da ciclicidade ovariana, reduzindo o período de anestro (PRATT et al., 1991).

A utilização isolada de indutores de ovulação não é suficiente na sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Contudo, a associação com progesterona/progestágeno, estradiol e PGF₂ α é capaz de induzir a ovulação sincronizada do folículo dominante encontrado no final da terapia tornando, assim, possível a IATF (BARUSELLI, 2004).

2.2.2 Estratégias para a sincronização da onda

Driancourt (2001) relata que eficientes protocolos de sincronização de estro precisam induzir a atresia dos folículos presentes nos ovários independente do estágio de desenvolvimento, resultando no recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular, desenvolvimento sincronizado de um folículo dominante em todas as fêmeas e a ovulação em momento pré-determinado.

Primeiramente, realiza-se a sincronização da onda folicular, para descartar, caso haja, um folículo dominante, que pode sofrer atresia, ovular ou mesmo sofrer parcial luteinização (THATCHER et al., 1989; MACMILLAN et al., 1991; PURSLEY et al., 1995; YAMADA et al., 2002). Estes dois últimos fatores, desencadeiam a elevação nos níveis de progesterona endógenos, impedindo outras ovulações por um período, sendo, este processo, possível através da utilização de um análogo do

GnRH (CARTMILL et al., 2001; LANE et al., 2001). O hormônio luteinizante poderia ser utilizado para obtenção do mesmo efeito, entretanto, o custo alto o torna inviável (SARTORI et al., 2001).

2.2.2.1 AGONISTAS DE HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA

A terapia com GnRH, realizada em qualquer fase do ciclo estral, induz a ovulação do folículo dominante no momento do tratamento, porém, este deve estar na fase de crescimento ou no início da fase estática, assim ocorrerá nova onda de crescimento folicular em dois ou três dias após (PURSLEY et al., 1995; BODENSTEINER et al., 1996). Segundo Wiltbank (1997) folículos com diâmetro de 9mm a 10mm que estão na fase de crescimento podem ovular, mesmo havendo corpo lúteo funcional, com níveis de progesterona alta, e os que não ovulam sofrem luteinização.

Pursley et al. (1995) verificaram em estudos da dinâmica folicular, no período de tratamento “*Ovsynch*”, que após a aplicação da primeira dose de GnRH, ocorre ovulação e se inicia uma nova onda de crescimento folicular, tendo como resultado um folículo dominante após sete dias, no dia de aplicação da prostaglandina.

Vasconcelos (1998) descreve uma taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH de 64%, utilizando 156 vacas Holandesas, com tratamentos realizados em diferentes períodos do ciclo estral. Este autor relatou, ainda, variação nas taxas ovulatórias em cada fase do ciclo estral em que as fêmeas foram tratadas. Os índices mais baixos foram observados em animais que estavam entre o dia um e quatro (23%), e as taxas mais elevadas entre os dias cinco e nove (96%). Após a administração de segunda dose de GnRH, as taxas de ovulação não sofrem influência da fase do ciclo estral em que o animal se encontra, porém, variam ($P < 0,01$) conforme a resposta à primeira dose aplicada do hormônio (92% quando houve ovulação e 79% quando não houve ovulação). Observou-se ovulações entre a aplicação de prostaglandina e a segunda dose de GnRH (6%) e decorridas 48 horas da aplicação da segunda dose de GnRH, 7% dos animais não ovularam.

A presença e a sensibilidade do folículo dominante à ação do LH endógeno estão relacionadas à fase folicular ovariana (GUINThER et al., 1996; SARTORI et

al., 2001). O folículo que inicia o desvio folicular é de, em média, aproximadamente 8,5mm de diâmetro (GINTHER et al., 1996). Embora sem muita clareza, sabe-se que os mecanismos que desencadeiam a divergência folicular podem estar intimamente relacionados à indução de receptores ao LH nas células da granulosa, com elevação das concentrações circulantes de estradiol-17 β e diminuição de FSH plasmático (GINTHER et al., 1996, 2000; Beg et al., 2001).

Apenas os folículos acima de 10mm (um dia pós divergência folicular) terão capacidade de ovular, mesmo que o desvio folicular ocorra com diâmetro de aproximadamente 8,5mm (SILCOX et al., 1995; PURSLEY et al., 1995; SARTORI et al., 2001). Isto, porque possuem elevadas concentrações de receptores para LH nas células da granulosa, que responderão as aplicações de GnRH (SARTORI et al., 2001).

Assim, se o início do tratamento ocorrer na presença do folículo dominante (acima de 10mm de diâmetro), haverá sincronização de uma nova onda folicular em 48 horas depois da aplicação do GnRH (PURSLEY et al., 1995; MACMILLAN et al., 2003). Caso a administração de GnRH ocorra antes da dominância folicular, o desenvolvimento da onda folicular poderá não ser alterado (RYAN et al., 1998).

2.2.2.2 BENZOATO DE ESTRADIOL

Comercialmente, na America do Sul, estão disponíveis diferentes tipos de ésteres de estradiol, benzoato de estradiol, valerato de estradiol e cipionato de estradiol. A administração de qualquer um destes ésteres é capaz de causar a regressão dos folículos antrais, quando utilizados na presença de progesterona em altas concentrações (BÓ et al., 1995). Dependendo da quantidade de progesterona sanguínea, o estrógeno atua inibindo ou estimulando a liberação de gonadotrofinas. Conforme Moraes et al. (2002), quando a concentração de progesterona é fisiológica ou baixa, o estrógeno irá estimular a liberação de LH para que haja ovulação; entretanto, quando há concentrações elevadas de progesterona, doses altas de estrógeno poderão impedir a liberação de gonadotrofinas, inibindo a produção e liberação de LH.

Segundo Bo et al. (1994), a associação de progestágenos a estradiol-17 β , benzoato de estradiol, aplicados em qualquer fase do ciclo estral, levam ao crescimento sincronizado de uma nova onda, três a quatro dias depois. Outros autores estudaram a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus* utilizando dispositivo intravaginal de progesterona associado a 2mg de benzoato de estradiol no dia 0, e identificaram que estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos genéticos no dia em que se inicia a onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2004; CARVALHO et al., 2004).

2.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

2.3.1 Objetivos da *aspiração folicular*

Através da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (PIETERSE et al., 1988; HILL, 1995; BOLS et al., 1997) é possível realizar o aproveitamento dos ovócitos, utilizando-os para produção *in vitro* de embriões. A aspiração folicular promove o recrutamento de outros folículos, pois ocorrerá uma nova onda de desenvolvimento folicular (GARCIA & SALAHEDDINE, 1998; AMIRIDIS et al., 1999; BARACALDO et al., 2000).

A técnica de produção de embriões *in vitro* com utilização da aspiração folicular possibilita o aperfeiçoamento e multiplicação de bovinos de alto valor genético e de outras espécies em extinção, aumenta o potencial de produção em fêmeas portadoras de infertilidade adquirida, além de fêmeas em gestação senis e jovens (RYAN et al., 1993; RICK et al., 1996; RIDDEL et al., 1997; FRY et al., 1998; EIKELMANN et al., 2000; GUYADER-JOLY et al., 2000).

2.3.2 Caracterização da Técnica da Aspiração Folicular

Em um estudo realizado na Holanda, conforme Pieterse et al. (1988), identificou-se que a utilização da técnica de aspiração transvaginal de oócitos em

bovinos, com o auxílio da ultrassonografia, possibilita que em uma mesma doadora se realiza repetidas recuperações de oócitos.

O desempenho da aspiração folicular sofre influência de diversos fatores técnicos e depende parcialmente da recuperação de oócitos, isto é, quantos oócitos foram obtidos baseando-se no número de folículos aspirados. A recuperação dependerá da visualização dos folículos (possível pelo uso de um equipamento de ultra-sonografia), do diâmetro, bisel e corte da agulha, a bomba de aspiração (vácuo exercido) e a capacidade do operador. Outros fatores também podem influenciar como os fatores biológicos, dentre eles citam-se a frequência e momento da aspiração folicular, fisiologia, condição corporal, raça e idade da doadora, estes são fundamentais nos resultados, interferindo na recuperação e no desenvolvimento embrionário (qualidade dos oócitos) (BOLS et al.,2005).

No início, a aspiração folicular era realizada somente com agulhas longas (55 cm), especialmente fabricadas para este fim (PIETERSE et al., 1988). Estas agulhas, devido ao elevado custo, e com o uso perdiam o gume, foram substituídas por agulhas hipodérmicas descartáveis, na tentativa de facilitar a recuperação de oócitos (BOLS et al., 1995).

Bols et al. (1997) relataram que é mais viável a utilização de agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) e 50 mm de comprimento. A utilização de agulhas de diâmetros diferentes, maiores que 18G, permitem a obtenção de altas taxas de recuperação, entretanto, haverá mais oócitos desnudos, e ainda pode danificar o estroma e aumentar a quantidade de sangue no líquido aspirado. Os índices de recuperação de oócitos com agulhas menores que 19G, são inferiores, o que pode ser explicado pela demora da aspiração do líquido folicular, durante a punção.

Segundo Bols et al. (1995) a pressão de vácuo está intimamente relacionada com a agulha utilizada. Pressões maiores que 120mm Hg, destroem a camada de revestimento do *cumulus oophorus*, e pressões menores, como 50 mm Hg, são insuficientes para aspiração folicular, relatando uma grande variação entre os trabalhos revisados, com valores de 40 a 400 mm Hg (BOLS et al., 1996). Entretanto, esses dados devem ser considerados com reservas, já que todo o sistema (comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo e

diâmetro da agulha) pode influenciar na pressão de vácuo final (SENEDA et al., 2005).

Há relatos de que as frequências entre 5 e 8 MHz são adequadas para se realizar a técnica de aspiração folicular, considerando no momento da punção a proximidade entre o ovário e o transdutor (VAN DER SCHANS et al., 1991; HENDRIKSEN et al., 2004). Entretanto autores citam frequências como ideais, como 5 MHz (CALLESEN, GREVE & CHRISTENSEN, 1987; HASLER et al., 1995), 6.5 MHz (BUNGARTZ et al., 1995) e 7.5 MHz (VAN DER SCHANS et al., 1991).

Outra variável de importância a se considerar é o tipo de transdutor utilizado. O transdutor endo-vaginal humano, ou micro-convexo, adaptou-se bem a anatomia de novilhas pré-púberes e vacas pequenas (SUAVÉ, 1998). Com a utilização deste tipo de transdutor também foi possível visualizar folículos em vacas de grande porte, pois apresentam imagem de alta resolução, possuem imagem com grande ângulo de abertura e facilitam a manipulação ovariana (AERTS et al., 2004).

Diversos autores relatam maior eficiência na aspiração folicular transvaginal com a utilização de transdutores convexos (LOONEY et al., 1994; MEINTJES et al., 1995; BOLS et al., 1996; BOLS et al., 1998; CARLIN et al., 1999), com poucos relatos de transdutores lineares (MATTHEWS, PETERSEN & VAN BEEK, 1995; HASHIMOTO et al., 1999).

2.3.3 Uso da aspiração folicular na sincronização

Martinez et al. (2000) demonstraram que a ablação do folículo dominante guiada por ultrassonografia promove rápida diminuição das concentrações de E2 e inibina, conseqüentemente uma descarga de FSH, induzindo a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 1,5 dias.

O crescimento dos folículos é dependente da liberação de FSH, suprimido por um feedback negativo, realizado pelo 17β – estradiol e a inibina dos folículos em crescimento. Os agentes causadores do feedback negativo desaparecem quando folículos grandes são aspirados, ocorrendo liberação de FSH, e uma nova onda de crescimento folicular (ADAMS, et al., 1992). Estudos realizados por Garcia e Salaheddine (1998), demonstraram que dois dias após a punção ocorreu a

emergência de crescimento e nova onda folicular, sugerindo que a aspiração folicular pode induzir e sincronizar a emergência da onda folicular subsequente.

CAPÍTULO 1

FOLÍCULOS RESIDUAIS SUBSEQUENTES À ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM BOVINOS

3 CAPÍTULO 1 – Folículos residuais subsequentes à aspiração folicular em bovinos

3.1 RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de folículos residuais pós-aspiração de folículos ovarianos de 8 e 12 mm de diâmetro, por meio da avaliação dos fatores endócrinos, analisando a interferência destas estruturas no desenvolvimento normal da dinâmica de crescimento. Foram selecionadas vacas da raça Holandesa (N=13) não lactantes e com dois ciclos estrais normais consecutivos; estas foram tratadas com 500mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) e 3 mg de norgestomet (Crestar®) (D0), 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) (D1), após a emergência da onda folicular foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos caracterizados pela ausência ou presença de implantes de norgestomet, cada tratamento dividido em dois grupos: presença do implante e folículo de 8 mm (G1), ausência do implante e folículo de 8 mm (G2), presença do implante e folículo de 12 mm (G3) e ausência do implante e folículo de 12 mm (G4). O monitoramento ultrassonográfico (Esaote Pie Medical®) foi realizado duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas. Os folículos ovarianos foram aspirados com 8 e 12mm e avaliados quanto à presença do resíduo ao processo de aspiração, quando residual, eram aspirados novamente. Os dados de dinâmica de crescimento folicular, perfil hormonal do plasma sanguíneo e do fluido folicular foram verificados quanto à distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk e comparadas nos diferentes tratamentos pelo teste t de student. Os dados de perfil de esteroideogênico dos folículos aspirados em diferentes diâmetros foram analisados pelo SAS GLM procedure para o principal efeito de tratamento e as comparações foram feitas pelo teste F. O nível de significância adotado foi de 5%. O tratamento com progestágeno não afetou o crescimento folicular. A taxa de folículo residual foi de 74.6%. O tratamento com progestágeno não afetou ($P>0.05$) o percentual de folículos residuais, independente do diâmetro do folículo, no entanto, o efeito do diâmetro folicular aproximou a significância estatística ($P=0.07$). Os folículos residuais cresceram cerca de 5 mm ao dia. Dos folículos residuais aproximadamente 65% se tornaram folículos ativos, 12% folículos luteinizados e 23% folículos inativos. Conclui-se que a presença de folículos residuais ocorre na

maioria dos folículos aspirados com maior frequência em 12 mm e grande parte ativos e com elevada concentração de estradiol.

Palavras-chave: esteroidogênese, *ovum pick-up*, produção *in vitro* de embriões, dinâmica folicular, vaca

3.2 ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the follicular persistence rate of ovarian follicles of 8 and 12 mm in diameter post-aspiration, through the evaluation of endocrine factors, analyzing the interference of these structures in the normal development of the dynamic growth. Holstein cows (N=13) non-lactating and with two consecutive normal estrous cycles were selected; they were treated with 500 mg of sodium cloprostenol (Sincrocio®) and 3 mg of norgestomet (Crestar®) (D0), 2 mg of estradiol benzoate (Sincrodiol®) (D1), randomly assigned to two treatments characterized by the absence or the presence of norgestomet implants, which were subdivided into four groups: presence of the implant and follicle of 8 mm (G1), absence of the implant and follicle of 8 mm (G2), presence of the implant and follicle of 12 mm (G3) and absence of the implant and follicle of 12 mm (G4). Ultrasound monitoring (Esaote Pie Medical®) was performed twice daily with an interval of 12 hours. The ovarian follicles were aspirated with 12 and 8 mm and evaluated for its persistence to the process of aspiration, when persistent these were aspirated again. The data on dynamics of follicle growth, hormone profile of the blood plasma and follicular fluid were checked for normal distribution, by Shapiro-Wilk test, and compared in different treatments by the student's t test. The steroidogenic profile data of the follicles aspirated at different diameters were analyzed by SAS GLM procedure for the main effect of treatment and the comparisons were made by the F test. The significance level adopted was 5%. Treatment with progesterone did not affect follicular growth. The persistence rate was 74.6%. Treatment with progesterone did not affect ($P>0.05$) the percentage of residual follicles, independent of the diameter of the follicle, however, the effect of the follicular diameter approached the statistical significance ($P=0.07$). The residual follicles grow approximately 5 mm per day. Of the residual follicles approximately 65% became active follicles, 12% luteinized follicles and 23% inactive follicles. It was concluded that the follicular persistence occurs in the majority of the follicles more frequently aspirated with 12 mm and most of the residual follicles were active and with high estradiol concentration.

Keywords: Steroidogenesis, *Ovum pick-up*, *In vitro* production of embryos, follicular dynamics, Cow

3.3 INTRODUÇÃO

No Brasil a pecuária bovina se caracteriza pelo sistema extensivo de produção a pasto e pelo grande número de animais. O rebanho conta com 169,9 milhões de cabeça que ocupam 170 milhões de hectares (IBGE, 2006). Segundo Rodrigues e Rodrigues (2000), para o aumento dos índices reprodutivos e zootécnicos a pecuária brasileira vem passando por um processo de tecnificação, onde grande parte do rebanho faz uso de alguma tecnologia como melhoramento da utilização de pastagem, alimentação intensiva, avaliação e seleção genética, manejo sanitário, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fertilização *in vitro* (FIV).

Na classificação mundial, o Brasil é o país que possui maior número de embriões bovinos produzidos *in vitro*. No país a produção *in vitro* de embriões (PIVE) até o fim dos anos 90 não era comercialmente expandida, utilizava-se rotineiramente apenas em laboratórios de pesquisa. No decorrer de cinco anos houve um avanço na utilização de PIVE em bovinos, e o Brasil passou a ser referência e o maior produtor mundial. Esta produção, até meados de 2003 mostrava-se em alta, mesmo ocorrendo variações, e após o ano de 2004, passou a ser a técnica mais utilizada em raças zebuínas para a produção de embriões. Com isso houve aumento no mercado nacional de embriões, que passou a produzir mais de 200.000 embriões/ano (VIANA et al., 2010).

Entre os anos de 2005 a 2009 a produção total de embriões apresentou uma tendência de estabilização, isso devido ao aumento no uso da PIVE e redução na utilização da TE. Verificou-se em 2008 que o percentual de embriões produzidos *in vitro* no Brasil, ultrapassou a metade do total de embriões produzidos no mundo, diferindo da produção de embriões *in vivo* que após 2003-2004 sofreu redução (VIANA et al., 2010).

Os principais desafios de hoje, em termos operacionais, estão relacionados às questões de maximizar eficiência, agregar outras biotécnicas e evitar oscilações nos resultados (SENEDA & BLASCHI, 2004). Neste sentido, Viana et al. (2001) observaram que a punção e aspiração folicular podem não induzir a regressão de folículos dominantes (com produção ativa de esteróides), sendo que estes folículos apresentam um rápido replechimento de seu conteúdo pré-aspirado, recuperação do crescimento folicular e possível retomada do processo esteroidogênico. A

presença destes folículos residuais ao processo de aspiração pode comprometer a dinâmica de desenvolvimento folicular ovariana e prejudicar os resultados de coletas posteriores.

Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de folículos residuais pós-aspiração de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento, verificar fatores endócrinos (locais e sistêmicos) envolvidos nesse processo e investigar a interferência destas estruturas no desenvolvimento normal da dinâmica de crescimento e renovação folicular.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Localidade

Este experimento foi conduzido no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), localizado no Município de Coronel Pacheco – MG e no Campo Experimental de Santa Mônica (CESM), localizado no Município de Valença – RJ, ambos pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Gado de Leite), durante o período de 15 de setembro a 01 de dezembro de 2010.

3.4.2 Delineamento Experimental

Foram utilizadas 13 vacas da raça Holandesa, não gestantes e não lactantes. Os animais foram avaliados previamente utilizando um aparelho de ultrassom Águila-Pró (Esaote Pie Medical® - Maastricht/Holanda) equipado com transdutor e de dupla frequência, sendo um linear (6,0 e 8,0 MHz) transretal e outro microconvexo endocavitário (5,0 e 7,5 MHz) transvaginal. Quanto à atividade cíclica ovariana, foram incluídos no experimento, somente vacas com dois ciclos estrais normais consecutivos (18 a 24 dias) e livres de patologias. Estas receberam dieta para vacas secas utilizada rotineiramente no CECP, para suplementação silagem de milho, concentrado, e minerais e água fornecidos *ad libido* e/ou controlados pelo consumo do próprio animal.

Foi utilizada em cada animal, uma dose intramuscular de 500µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, Ribeirão Preto, Brasil), com a finalidade de regredir o corpo lúteo. O dia da administração da PGF2α foi considerado o dia experimental zero (D0). Simultaneamente, cada animal recebeu um implante auricular subcutâneo de 3 mg de norgestomet (Crestar®, Intervert International B.V., Boxmeer, Holanda), para controlar a concentração de progesterona e evitar a formação de um novo corpo lúteo.

Para sincronizar a próxima onda de desenvolvimento folicular as vacas receberam uma dose de 2 mg/animal de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Ribeirão Preto, Brasil) pela via intramuscular no dia um (D1).

Após a emergência da onda folicular os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois tratamentos, caracterizados pela ausência (retirado do implante na emergência folicular) ou presença de implantes auriculares de norgestomet. Cada tratamento foi dividido em grupos de acordo com o diâmetro do folículo aspirado. No grupo 1 (G1) foram colocados animais com implante e folículo com 8mm de diâmetro; grupo 2 (G2) animais sem implante e folículo com 8mm de diâmetro; grupo 3 (G3) animais com implante e folículo com 12mm de diâmetro; grupo 4 (G4) animais sem implante e folículo com 12mm de diâmetro.

Após a emergência da onda folicular os animais tiveram os folículos aspirados em diferentes diâmetros até completa um total de 18 folículos por grupo, estes sendo caracterizados pela ausência (retirado do implante dos animais) ou presença de implantes auriculares de norgestomet e diâmetro do folículo aspirado.

Os grupos se caracterizaram pela presença do implante e folículo aspirado com 8mm de diâmetro – grupo 1 (G1); ausência de implante e folículo aspirado com 8mm de diâmetro – grupo 2 (G2); presença do implante e folículo aspirado com 12mm de diâmetro – grupo 3 (G3); ausência do implante e folículo aspirado com 12mm de diâmetro – grupo 4 (G4).

3.4.3 Procedimentos experimentais

Monitoramento ultrassonográfico

Os ovários foram mapeados e acompanhados quanto a dinâmica folicular (mensuração dos folículos) pelo monitoramento ultrassonográfico, que foi realizado uma vez ao dia até a emergência da primeira onda folicular, a partir deste momento realizou-se o exame duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, utilizando o aparelho de ultrassom Áquila-Pró (Esaote Pie Medical® - Maastricht/Holanda) equipado com transdutor linear de dupla frequência (6,0 e 8,0 MHz) usado pela via transretal.

Aspiração folicular e recuperação do fluido folicular

Os folículos ovarianos foram aspirados em diferentes estádios de desenvolvimento após a emergência (8 e 12mm) e avaliados quanto à formação de folículo residual por 48 horas, quando presentes eram aspirados novamente.

A onda de crescimento folicular, emergida após a aspiração do folículo de 12mm, foi utilizada para o acompanhamento da dinâmica e aspiração do folículo de 8mm . Desta forma, foi possível aspirar folículos de forma contínua.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom Águila-Pró (Esaote Pie Medical® - Maastricht/Holanda) equipado com transdutor micro-convexo endocavitário de dupla frequência (5,0 e 7,5 MHz), utilizado por via transvaginal conectado a guia de biópsia com agulhas 19 G, e circuito de aspiração (WTA Watanabe Technoologia Aplicada, Cravinhos, Brasil) em tubos cônicos (tipo Falcon) de 50 mL com eppendorf adaptado na saída do circuito (adaptado de VIANA et al., 2003). A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba (WTA), ajustada a 60 mmHg.

Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal, antes de cada aspiração, fez-se anestesia epidural com 5 mL de Lidocaína a 2% (Lidovet, Laboratório Bravet, São Paulo), em seguida o transdutor foi inserido até o fundo da vagina e, com o auxílio da manipulação transretal posicionou-se o ovário com o folículo a ser aspirado a frente do transdutor e quando a agulha se aproximava do folículo, a bomba de vácuo era ligada, a agulha introduzida e o folículo aspirado, antes da retirada da agulha a bomba era desligada para evitar contaminação da amostra.

O material aspirado de cada folículo, foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos, seu sobrenadante quantificado e transferido para outro eppendorf previamente identificado e armazenado em freezer – 20°C, para avaliação da concentração hormonal de progesterona e estradiol.

Dosagem hormonal

As concentrações de estradiol e progesterona do fluido folicular dos folículos e seus respectivos folículos residuais foram determinados por radioimunoensaio de fase sólida utilizando-se kits comerciais de análise por I¹²⁵ (Coat-a-Count®, Medlab),

no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP campus de Botucatu – SP (matrícula CNEN 14542).

3.4.4 Análises Estatísticas

Os dados de dinâmica de crescimento folicular, perfil hormonal do plasma sanguíneo e do fluído folicular foram verificados quanto à distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados pelo SAS MIXED procedure (version 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para os principais efeitos de tratamento, hora e a suas interações (tratamento x hora), usando um REPEATED statement para medidas sequenciais.

As variáveis listadas no tópico acima foram comparadas nos diferentes tratamentos pelo teste t de student. Os dados de perfil de esteroideogênico dos folículos aspirados em diferentes diâmetros foram analisados pelo SAS GLM procedure para o principal efeito de tratamento e as comparações foram feitas pelo teste F. O nível de significância adotado foi de 5% e os valores entre 5 e 10% foram considerados aproximações da significância. Os dados serão apresentados como média \pm DP, ou de outra forma caso necessário.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Crescimento folicular

O tratamento com progestágeno não afetou o crescimento folicular. Esta observação foi comprovada quando se comparou o intervalo da emergência até a aspiração do folículo dominante entre os grupos 1 e 2 (diâmetro à aspiração semelhante a 8 mm) e, posteriormente entre os grupos 3 e 4 (diâmetro à aspiração semelhante a 12 mm). Os grupos 1 e 2 diferiram pelo tratamento (G1) ou não com progestágeno (G2). Entre estes dois grupos, o intervalo da emergência à aspiração folicular foi semelhante (63.5 ± 4.5 vs 65.3 ± 5.2 horas, respectivamente para G1 e G2). Nestes dois grupos, o crescimento folicular foi representado até 60 horas antes da aspiração e somente o efeito Hora foi significativo ($P < 0.0001$), indicando que o folículo dominante cresceu entre -60 horas e o momento da aspiração folicular (Figura 1), e este crescimento foi semelhante entre os grupos 1 e 2. Da mesma forma, o crescimento do folículo dominante até atingir a dominância completa (aproximadamente 96 horas) foi semelhante entre os grupos tratado (G3) ou não com progestágeno (G4), (Figura 1).

O padrão de crescimento folicular nos grupos tratados ou não com progesterona foram semelhantes, diferente do encontrado por Karsch et al. (1977), onde demonstrou-se que animais tratados com progesterona exógena retarda o crescimento folicular em ratas, e *in vitro*, apresenta efeito inibitório na secreção de estrógeno pelas células da granulosa e Noel et al. (1994), relatam que a progesterona via eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, tem sido associado com a supressão do crescimento folicular e ovulação.

Savio et al. (1993) e Yavas & Walton (2000), demonstraram que concentrações de progesterona liberadas por dispositivos mantiveram-se abaixo das encontradas em fase luteal, aumentando a pulsatilidade de LH e ocasionando maior crescimento do folículo dominante, podendo justificar os resultados achados.

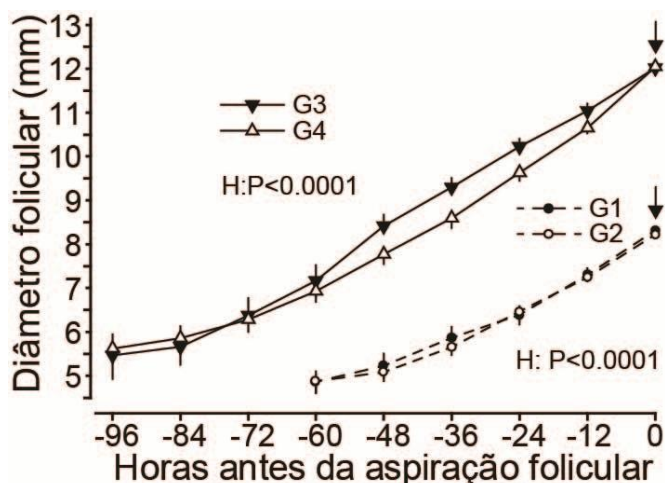


Figura 1. Desenvolvimento folicular antes da aspiração do folículo dominante em cada um dos grupos estudados. Folículo dominante aspirado aproximadamente aos 8 mm de diâmetro: Tratado (G1) ou não com progestágeno (G2). Folículo dominante aspirado aproximadamente aos 12 mm de diâmetro: Tratado (G1) ou não com progestágeno (G2). Setas indicam o momento da aspiração folicular.

3.5.2 Percentual de folículo residual após a aspiração do conteúdo folicular e perfil hormonal dos folículos residuais

Dezoito (18) folículos foram incluídos em cada grupo tratado, perfazendo um total de 72 folículos aspirados. Um folículo do grupo 4 não apresentou níveis detectáveis de estradiol e foi excluído das análises estatísticas, desta forma o total de folículos aspirados foi reduzido para 71. As avaliações ultrassonográficas posteriores ao processo de aspiração detectaram 53 (74.6%) folículos com antro novamente preenchido (denominado residual). Baseado nos exames ultrassonográficos a cada 12 horas, os folículos residuais foram detectados entre 12 e 24 horas após a aspiração. O tratamento com progestágeno não afetou ($P > 0.05$) o percentual de folículos residuais, independente do diâmetro do folículo dominante no momento da aspiração. Este fenômeno foi observado em 74.3% (26/35, grupos 2 e 4) dos folículos provenientes de animais tratados com progestágeno e 72.2% (26/36, grupos 1 e 3) daqueles não tratados (Tabela 1). No entanto, o efeito do diâmetro folicular no momento em que o procedimento de aspiração foi realizado aproximou a significância estatística ($P = 0.07$), mostrando que a frequência com que este fenômeno foi detectado após a aspiração de folículos mais desenvolvidos (12 mm de diâmetro) tendeu a ser maior (82.8%, 29/35) do que após a aspiração de folículos mais jovens em relação à seleção folicular (8 mm, 63.9%, 23/36). De acordo com Van Den Hurk & Zhao (2003), esse resultado pode ser fundamentado por uma

continuidade na produção do fluido folicular pelas múltiplas camadas da granulosa na fase de dominância e manutenção da esteroidogênese do folículo pela ação dos hormônios gonadotróficos.

Tabela 1. Ocorrência de folículos residuais após a aspiração do folículo dominante em diferentes estádios de desenvolvimento provenientes de vacas Holandesas tratadas ou não com progestágeno

Tratamento	N	Folículos residuais (%)
Progestágeno	35	26 (74.3)
Sem progestágeno	36	26 (72.2)
Folículo de 12 mm	35	29 (82.8) ^a
Folículo de 8 mm	36	23 (63.9) ^b

^{a,b} Percentuais seguidos de letras diferentes na mesma coluna aproximaram a diferença estatística (P=0.07).

O fluido folicular foi recuperado tanto do folículo aspirado, quanto do residual formado após a aspiração. As análises de estradiol e progesterona no fluido folicular do folículo permitiram definir algumas características de cada grupo antes da formação do folículo residual.

Entre os grupos 1 e 2, apesar do diâmetro semelhante no momento da aspiração folicular, o fluido proveniente de folículos aspirados de animais tratados com progestágeno (Grupo 1) apresentaram menor concentração de progesterona (Tabela 2). Consequentemente, a relação estradiol:progesterona (E2:P4) foi maior no grupo 1, uma vez que os níveis de estradiol foram semelhantes entre estes dois grupos (P>0.05). As características esteroidogênicas avaliadas foram semelhantes entre os grupos tratados (Grupo 3) ou não com progestágeno (Grupo 4), onde o folículo dominante foi aspirado com aproximadamente 12 mm (Tabela 2). A esse respeito, observa-se que a menor concentração de progesterona pode ser justificada por Greenwald & Roy (1994), que descreveram que o folículo ovariano produz hormônios esteróides, cuja concentração e atividade biológica variam de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular e fase do ciclo estral no qual se encontram.

Tabela 2. Perfil esteroidogênico dos folículos aspirados em diferentes diâmetros e tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4)

Grupo	N	Diâmetro Folicular (mm)	Estradiol (E2) ng/ml	Progesterona (P4) ng/ml	E2:P4
1	18	8.3±0.1 ^a	304.0±64.2 ^b	5.8±1.5 ^b	180.4±77.9 ^a
2	18	8.2±0.1 ^a	266.1±52.3 ^b	23.4±7.1 ^a	22.8±6.0 ^b
3	18	12.0±0.2	815.9±150.6	37.8±10.0	51.6±11.5
4	17	12.0±0.1	831.2±193.0	33.0±5.8	38.8±8.5

^{a,b} Entre os grupos 1 e 2, os valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste "T" de Student (P=0.0002).

^{A,B} Entre os grupos 1 e 2, os valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste "T" de Student (P<0.05).

Em todos os grupos, tanto o diâmetro folicular quanto o perfil dos esteróides analisados foram aproximadamente semelhantes entre os folículos que se apresentaram ou não como residuais após a aspiração (Tabela 3). Somente nos grupos 3 e 4, o fluído dos folículos residuais apresentou maiores (P=0.05 e 0.03, respectivamente) concentrações de progesterona quando comparado àqueles que não formaram folículos residuais (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil esteroidogênico dos folículos que se tornaram (Sim) ou não residuais após a aspiração em diferentes diâmetros e, tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4)

Grupo	Folículo Residual	Diâmetro Folicular (mm)	Estradiol (E2) ng/ml	Progesterona (P4) ng/ml	E2:P4
1	Sim (n=12)	8.3±0.1	392.7±82.3	6.8±2.0	127.0±35.9
	Não (n=6)	8.3±0.2	126.8±52.6	3.6±1.8	51.9±22.2
2	Sim (n=11)	8.2±0.1	252.1±64.0	17.0±3.7	22.7±7.2
	Não (n=7)	8.2±0.1	288.2±95.2	33.4±17.5	22.9±11.0
3	Sim (n=15)	12.0±0.2	843.0±178.5	43.4±11.5 ^a	46.4±13.2
	Não (n=3)	12.0±0.2	680.0±175.6	9.8±4.0 ^b	77.3±17.2
4	Sim (n=14)	12.0±0.2	858.7±224.2	37.4±6.4 ^a	33.8±8.5
	Não (n=3)	12.0±0.2	703.2±393.2	12.4±3.4 ^b	61.98±27.5

^{a,b} Dentro de um mesmo grupo, os valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, aproximam a diferença estatística pelo teste "T" de Student (P<0.05).

Os folículos residuais foram agrupados de acordo com o grupo de tratamento ao qual foi proveniente. Aproximadamente sessenta e seis por cento (66.7%) dos folículos aspirados no grupo 1 apresentaram folículos residuais (12/18). Esta alta

proporção também foi observada no grupo 2 (61.1%, 11/18). Apesar da diferença numérica (10.0 ± 0.5 vs 9.1 ± 0.4 mm, respectivamente, para os grupos 1 e 2), o diâmetro do folículo residual, antes de ser amostrado, também foi semelhante ($P=0.1$) entre os grupos (tabela 4). No entanto, as concentrações de estradiol e progesterona foram menores nos folículos residuais provenientes de folículos de 8 mm não tratados com progestágeno.

Informações semelhantes foram recuperadas dos folículos residuais formados após a aspiração de folículos dominantes de aproximadamente 12 mm de diâmetro, tratados (Grupo 3) ou não com progestágeno (Grupo 4). O diâmetro do folículo residual imediatamente antes da amostragem, bem como as concentrações de progesterona e a relação E2:P4, foram semelhantes ($P>0.05$) entre os grupos 3 e 4 (Tabela 4). No entanto, as concentrações de estradiol foram superiores ($P=0.05$) nos folículos residuais provenientes de folículos de animais tratados com progestágeno (900.9 ± 235.2 vs 390.7 ± 217.8 ng/ml para os grupos 3 e 4, respectivamente). A partir desses resultados é possível considerar que a diferença nas concentrações entre os grupos tratados ou não com progestágeno pode ser em decorrência da frequência de pulsatilidade do LH.

Tabela 4. Perfil esteroidogênico dos folículos residuais formados após a aspiração em diferentes diâmetros e tratados (Grupos 1 e 3) ou não com progestágeno (Grupos 2 e 4)

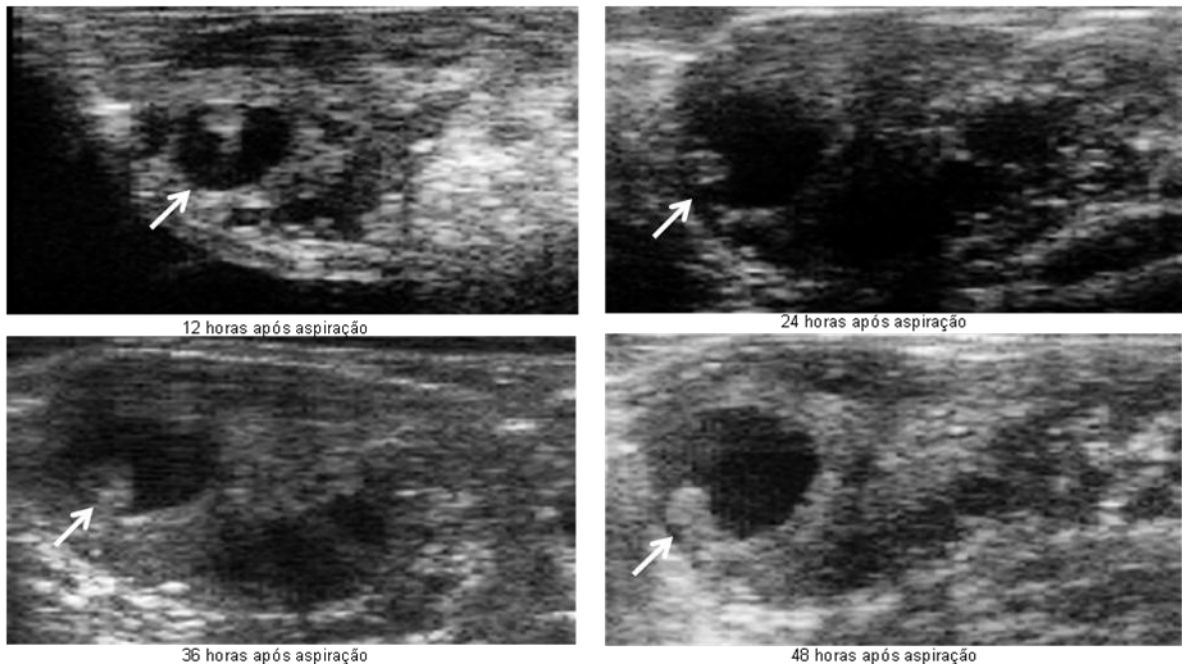
Grupo	N	Diâmetro Folicular (mm)	Estradiol (E2) ng/ml	Progesterona (P4) ng/ml	E2:P4
1	12	10.0 ± 0.5	555.0 ± 115.8^a	88.4 ± 42.2^a	23.7 ± 12.2
2	11	9.1 ± 0.4	317.6 ± 150.1^b	26.6 ± 10.2^b	13.6 ± 4.9
3	15	10.4 ± 0.4	900.9 ± 235.2^A	224.3 ± 114.0	28.1 ± 11.4
4	14	11.1 ± 0.6	390.7 ± 217.8^B	467.0 ± 172.0	14.5 ± 8.9

^{a,b} Entre os grupos 1 e 2, os valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, aproximam a diferença estatística pelo teste "T" de Student ($P=0.08$).

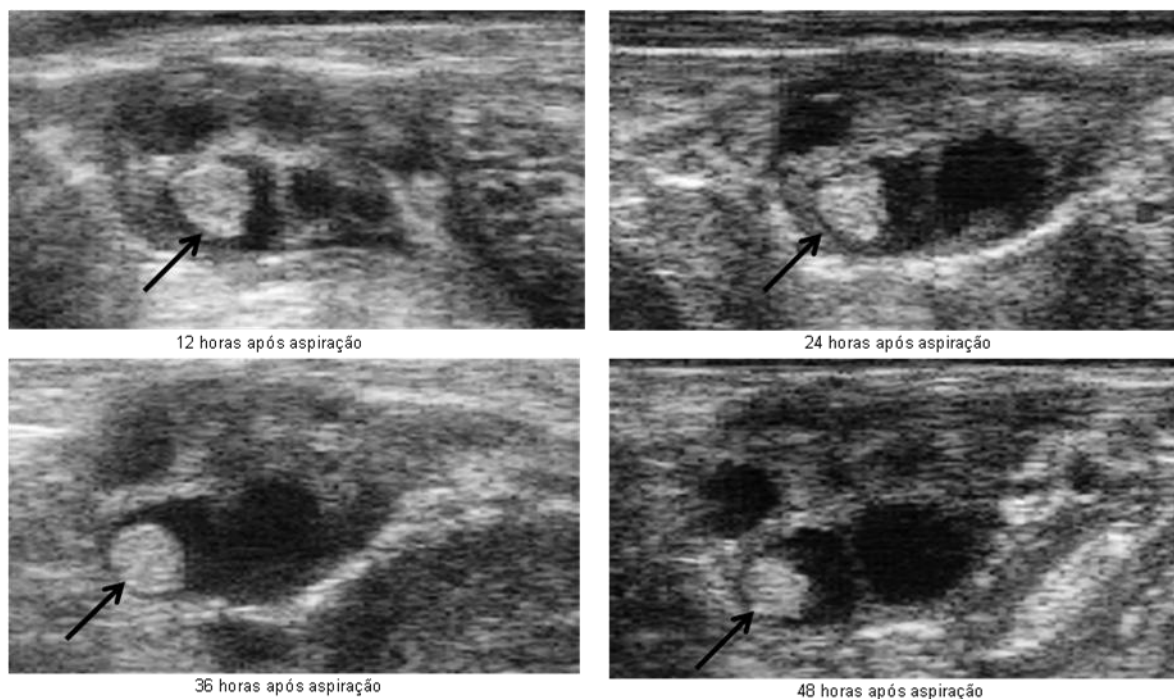
^{A,B} Entre os grupos 1 e 2, os valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste "T" de Student ($P=0.05$).

Independente do diâmetro folicular antes da aspiração, o intervalo para a segunda aspiração (amostragem do folículo residual) foi semelhante entre os grupos (49.0 ± 5.0 ; 46.9 ± 6.4 ; 43.2 ± 4.8 e 39.4 ± 4.1 horas, respectivamente para os grupos de 1 a 4). Considerando todos os grupos, o diâmetro médio do folículo residual foi de 10.2 ± 0.2 mm e, somente no grupo 2 o diâmetro foi inferior a este valor, porém a estatística somente aproximou a significância ($P=0.08$). Apesar desta observação,

nos dois grupos onde os folículos dominantes foram aspirados com 8 mm de diâmetro (grupo 1 e 2) os folículos residuais alcançaram, em aproximadamente 48 horas, diâmetros superiores (1.7 e 0.9 mm, respectivamente) aos próprios folículos aos quais foram provenientes (Tabela 5). De outra forma, os folículos residuais provenientes de folículos aspirados com 12 mm foram amostrados com diâmetros menores (-1.7 e -1.0 mm, respectivamente). Estas observações nos indicam que, independente do diâmetro em que o folículo dominante foi aspirado, o folículo residual, quando presente – ocorrência variando entre 64 e 83% dos folículos aspirados – se desenvolve de maneira rápida e semelhante. Considerando um crescimento de aproximadamente 10 mm em um intervalo de aproximadamente 44 horas, o que significa cerca de 5 mm ao dia (Figura 2 e 3).



Figuras 2 – Seqüência de imagens ultrassonográficas do folículo residual com 12, 24, 36 e 48 horas após aspiração do folículo de 8 mm.



Figuras 3 – Seqüência de imagens ultrassonográficas do folículo residual com 12, 24, 36 e 48 horas após aspiração do folículo de 12 mm.

O perfil hormonal antes e após a aspiração folicular está representando na tabela 4. A mudança mais significativa foi no perfil do folículo de 12 mm no grupo não tratado com progestágeno (Grupo 4). Observou-se uma queda na concentração de estradiol e um acréscimo na concentração de progesterona no fluido folicular do residual em comparação ao folículo normal. Pode-se entrever um efeito dos baixos níveis de progesterona circulantes sobre a atividade das células foliculares e/ou somente um efeito temporal, uma vez que o controle da pulsatilidade do LH se encontrava reduzido neste grupo. Adicionalmente, no grupo 2 as concentrações de progesterona também foram maiores no folículo residual.

Tabela 5. Diferenças médias no diâmetro e perfil esteroidogênico entre os folículos aspirados em cada um dos grupos e seu correspondente residual

Grupo	N de pares	Diâmetro Folicular (mm)	Estradiol (E2) ng/ml	Progesterona (P4) ng/ml
1	12	1.7±0.4***	162.4±118.3	88.9±44.7*
2	11	0.9±0.4**	65.5±160.5	9.6±10.5
3	15	-1.7±0.4***	57.9±199.3	180.9±115.8
4	15	-1.0±0.6	-530.7±133.9***	429.6±171.7**

* Valor de P<0.1; ** Valor de P<0.05; *** Valor de P<0.01.

3.5.3 Estudo dos folículos normais e residuais de acordo com o perfil da atividade esteroidogênica

Os folículos foram separados de acordo com a atividade esteroidogênica considerando o coeficiente de variação intra-ensaio do estradiol que foi de 12.7%. Em cada um dos grupos, as concentrações de estradiol foram ranqueadas da menor para a maior e uma análise visual dos dados permitiu a identificação de variações bruscas nos valores. A partir da identificação deste ponto, um valor acima e outro valor abaixo foram incluídos, perfazendo um total de 4 valores, para posterior cálculo das respectivas médias e desvios padrão de cada grupo. Cada valor CV (Média/desvio padrão) calculado foi comparado ao valor do CV intra-ensaio das concentrações de estradiol. Quando o valor calculado de CV superou em 2.5 vezes o valor do CV intra-ensaio, o ponto de variação foi confirmado como ponto de alteração da atividade esteroidogênica e a média dos 4 valores foi considerada como concentração limite. Admitindo como folículo ativo aqueles que apresentaram concentrações de estradiol acima do valor médio calculado. Os mesmos procedimentos foram adotados para caracterizar os folículos residuais.

De acordo com o ranqueamento dos folículos com o perfil esteroidogênico foi possível separar os folículos residuais em 3 categorias. Os folículos ativos apresentaram alta concentração de estradiol, ao passo que os folículos luteinizados continham progesterona em altos níveis e os folículos inativos apresentavam baixas concentrações dos esteróides analisados (Tabela 6). Os folículos residuais considerados inativos aparentemente desenvolveram de maneira mais lenta, refletindo em um menor diâmetro imediatamente antes da amostragem. Adicionalmente, a relação estradiol:progesterona foi um reflexo do hormônio presente em maior concentração nos folículos residuais ativos e/ou luteinizados, de forma que a relação foi maior nos folículos ativos em virtude da maior concentração de estradiol (Tabela 6).

Hafez & Hafez (2004), demonstraram que os níveis tônicos ou basais de LH agem juntamente com o FSH na tentativa de induzir a secreção de estrógenos do folículo ovariano desenvolvido, justificando a maioria dos folículos residuais ativos e quando ocorre pico pré-ovulatório do LH haverá rompimento da parede do folículo e ovulação, processo que foi mimetizado pela aspiração folicular com possível influência de concentrações crescentes de LH na parede do folículo e posterior

luteinização da mesma, se tornando uma estrutura predominantemente produtora de progesterona.

Tabela 6. Características dos folículos residuais em função do perfil esteroideogênico

Categoria dos FR	F8/F12	Diâmetro	Estradiol (E2)	Progesterona (P4)	E2:P4
Ativo	17/17	10.8±0.3 ^a	833.6±128.7 ^a	130.2±52.4 ^b	30.3±7.0 ^a
Luteinizado	0/6	10.6±0.8 ^a	1.6±0.8 ^b	1078.4±232.6 ^a	0.0±0.0 ^b
Inativo	6/6	8.4±0.4 ^b	33.0±12.8 ^b	30.0±8.1 ^b	1.1±0.3 ^b

^{a,b} Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste de Duncan (P<0.05).

Analisando os folículos antes da aspiração folicular é possível correlacionar algumas de suas características com a evolução após a aspiração. No momento da aspiração folículos menores formam folículos residuais com menor frequência que folículos maiores (Tabela 6). Este fato já havia sido considerado acima, com a maior ocorrência de folículos residuais provenientes de folículos aspirados com 12 mm. Outra observação importante é a independência do diâmetro folicular na formação de folículos residuais ativos. Trinta e quatro dos 52 folículos residuais (65.4%) e todos foram provenientes de folículos com alta concentração de estradiol, sendo metade proveniente de folículos de 8 mm e a outra metade de folículos de 12 mm (Tabela 7). O fator crucial para a formação de um folículo residual ativo é a concentração de estradiol do folículo a ser aspirado.

Todos os folículos residuais considerados como luteinizados (alta concentração de progesterona) foram provenientes de folículos aspirados aos 12 mm de diâmetro. Somente um folículo pertencia ao grupo tratado com progestágeno (Grupo 3), os demais pertenciam ao grupo 4. Este fato reforça a teoria de que durante o intervalo da primeira para a segunda aspiração a parede folicular parece ter sido influenciada por concentrações crescentes de LH, principalmente no grupo que não foi tratado com progestágeno.

Tabela 7. Perfil esteroidogênico dos folículos que, após a aspiração, resultaram na formação das diferentes categorias de folículos residuais

Folículo aspirado F8/F12	Diâmetro	Estradiol (E2)	Progesteron a (P4)	E2:P4	Evolução após aspiração
13/6	9.4±0.4 ^b	364.6±87.2 ^{ab}	17.7±7.3	46.2±9.6 ^{ab}	FR Ausente
17/17	10.2±0.3 ^{ab}	770.2±118.8 ^a	27.5±6.0	68.7±14.3 ^a	FR Ativo
0/6	11.7±0.3 ^a	337.5 ±118.1 ^{ab}	30.5±14.4	43.1 ±20.0 ^{ab}	FR Luteinizado
6/6	10.2±0.6 ^{ab}	328.4±132.6 ^b	29.0±5.4	24.3±14.4 ^b	FR Inativo

FR – Folículo residual.

^{a,b} Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste de Duncan (P<0.05).

3.6 CONCLUSÕES

A presença de um folículo residual após à aspiração folicular ocorre na maioria dos folículos aspirados com diâmetro de 8 e 12mm, mostrando ainda que a frequência com que este fenômeno foi detectado após a aspiração de folículos de 12 mm tendeu a ser maior do que após a aspiração de folículos mais jovens em relação à seleção folicular.

Grande parte dos folículos persistentes eram folículos ativos com elevada concentração de estradiol e originados em sua totalidade de folículos com alta concentração de estradiol.

3.7 REFERÊNCIAS

GREENWALD, G.S.; ROY, S. Follicular development and its control. In: KNOBIL, L.E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2 edição. Nova York: Raven Press, 1994, p. 629-724.

HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 7. ed. 2004. 513p.

KARSCH, F.J.; LEGAN, S.J.; HAUGER, R.L. et al. Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: Dependence on the ovaries. **Endocrinology**, v.101, p.800-806, 1977.

NOEL, B.; BISTER, J.L.; PIERQUIN, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**, v.41, p.719-727, 1994.

SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; MORRIS, G.R. et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v.98, p.77-84, 1993.

SENADA, M.M & BLASCHI, W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. p. 231-237, 2004.

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

VIANA J.H.M.; CAMARGO L.S.A.; Sá W.F.; FERNANDES C.A.C.; ARAUJO M.C.C.; MARQUES JÚNIOR A.P. Effect of the presence of non-regressed follicles after oocyte pick-up on follicular dynamics of bos indicus cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 334, 2001.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO L.S.A.; SÁ W.F.; FERNANDES C.A.C.; MARQUES JÚNIOR A.P. Efeito da pré-estimulação ovariana sobre

características de oócitos após punção folicular em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

VIANA J.H.M.; SIQUEIRA L.G.B.; PALHÃO M.P.; CAMARGO L.S.A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae** (Online), v. 38, p. s661-s674, 2010.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beff cows. A review. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.1-23, 2000.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demonstração da grande taxa de folículos residuais após aspiração de folículos durante a divergência e na fase de dominância, com permanência da atividade esteroidogênica levanta uma nova linha de pensamento sobre a atividade ovariana em ovários aspirados, necessitando de maiores estudos para melhores elucidaciones da interferência destes folículos na endocrinologia reprodutiva de vacas da raça Holandesa.

5 REFERÊNCIAS GERAIS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.; 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1992. v. 94, p. 177-88.

AERTS, J.M.J., LEROY, J.L.M.R., BOLS, P.E.J. The use of an endovaginal ultrasound micro-convex array transducer adapted for tranvaginal oocyte retrieval in the cow. In: **International Congress on Animal Reproduction**, 15., 2004, Porto Seguro, Brasil. Abstracts... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. v. 2, p. 435.

ALVES, N.G.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiças Holandês x Zebu, durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n.2, p. 627-634. 2002.

AMIRIDIS, G.S.; ROBERTSON, L.; REID, S.; BOYD, J.S.; O'SHAUGHNESSY, P.J.; JEFFCOATE, I.A. Plasma estradiol, FSH and LH concentration after dominant follicle aspiration in the cow. **Theriogenology**, Gainesville, v. 52, p. 995-1003, 1999.

ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C.G.; HOGG, C.O.; GLAZYRIN, A.L.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Insuline-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and development status. **Endocrinology**. v.139, p. 2146-2154, 1998.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory responses following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, Gainesville, v. 53, p. 1239-1250, 2000.

BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.10, p.1-19, 2006.

BARUSELLI, P.S. **Manual prático de inseminação artificial em tempo fixo**. Curitiba: Biogenesis Brasil, 2004. 56p.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicularfluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**. v.64, p.432-441, 2001.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 [beta] treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p.1555-1569,1994.

BÓ, G.A., ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergency in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.

BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER. O.J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45: p. 1115:1128, 1996.

BOLS, P.E.J., VANDENHEEDE, J.M.M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-687, 1995.

BOLS, P.E.J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P.E.J. Bovine oocyte retrieval: which follicles to puncture? Merelbeke, 1997. 225 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – University of Ghent, Belgium , 1997.

BOLS, P.E.J., YSEBAERT, M.T., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; 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. 983-995, 1998.

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

BRAW-TAL, R., ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. **Reproduction**, v.129, p.453-461, 2005.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-675, 1995.

BURATINI JUNIOR, J. Foliculogênese em bovinos. In: **II SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA** – Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2, 2006, Paraná. Anais..., Paraná, 2006, 201p.

CALLEJAS, S.S. Fisiología del ciclo estral bovino. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de la reproducción**. Mar del Plata: Reprobiofec, 2001. p.37-49.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, p. 217, 1987. (Abstract).

CARLIN, S.K.; GARST, A.S.; TARRAF, C.G.; BAILEY, T.L.; MCGILLIARD, M.L.; GIBBONS, J.R.; AHMADZADEH, A.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p.1489-1503, 1999.

CARTMILL, J.A.; EL-ZARKOUNY, S.Z.; HENSLEY, B.A.; LAMB, G.C.; STEVENSON, J.S. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. . **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1051-1059, 2001.

CARVALHO, J.B.P.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Follicular Wave and Luteal Function in *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers treated with progesterone device. In: **15 th International Congress and Reproduction Animal**, 2004, Porto Seguro. ICAR 2004. Belo Horizonte : Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v. 1. p. 112-112.

CLARKE, J.J. GnRH Secretion. In: **International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, 5., 1988, Dublin. Anais... Dublin: [1988]

CORTVRINDT, R.G.; HU, Y.; LIU, J.; SMITZ, J.E. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. **Fertil Steril**, v.70, p.1114-1125, 1998.

Driancourt M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**. v.55, p.1211-1239, 2001.

EIKELMANN, E.; FRANK, K.U.; SHINDLER, L.; NIEMANN, H. Repeated ultrasound follicular aspiration in pregnant heifers and cows. **Theriogenology**, Gainesville, v. 53, p. 351, 2000.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Mol Cell Endocrinol**, v.163, p.53-60, 2000.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.648-654, 2001.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004.

FRY, R.C.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, Gainesville, v. 49, p. 1077-1082, 1998.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, Gainesville, v. 50, p. 575-585, 1998.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**. v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science.**, v.60, p.61-79, 2000.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science.** v.78, p.239-257, 2003.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 6 – 10.

GOODMAN, R.L. and KARSCH, F.J. Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone: Differential Suppression by Ovarian Steroids *Endocrinology*. 1980, 107, p.1286-1290.

GUYADER-JOLY, G.; DURAND, M.; MOREL, A.; PONCHON, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; GUERIN, B.; HUMBLLOT, P. Sources of variation in blastocyst production in a commercial ovum pick-up, in vitro embryo production program in dairy cattle. **Theriogenology**, Gainesville, v. 53, p. 355, 2000.

HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** São Paulo: Manole. 7. ed. 2004. 513p.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, p. 131-138, 1999.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTTGEN, P.J.; JIN, Z.O.; 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. et al. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, p.909-902, 2004.

HILL, B.R. A simple method of transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, Gainesville, v. 43, p. 235, (Abstr), 1995.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 – Dados Preliminares**, Rio de Janeiro, p.1-146, 2006.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34 (suppl), p. 39-54, 1987.

LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. The effect of estradiol benzoate or a synthetic gonadotropin-releasing hormone used at the start of a progesterone treatment on estrus response in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.79-90, 2001.

LEVI-SETTI, P.E.; CAVAGANA, M.; BAGGIANI, A.; ZANONNI, E.; COLOMBO, G.V.; LIPRANDI, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. **Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.115, p.34-39, 2004.

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.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-3626, 1992.

MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W.W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.45, p. 883-889, 1991.

MACMILLAN, K.L.; SEGWAGWE, B.V.E.; PINO, C.S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 327-344, 2003.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23-30, 2002.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; DE FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008.

MATTHEWS, L.; PETERSEN, H.; VAN BEEK, K. Use of linear ultrasound transducer for commercial application of transvaginal oocyte recovery. **Theriogenology**, v. 43, p. 275, 1995. (Abstract).

McNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of reproduction and fertility**, Supplement, n.54, p.3-16, 1999.

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; BROUSSARD, J.R.; PAUL, J.B.; GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 967-974, 1995.

MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLÉMENT, F.; BOSCH, M.; PISSELET, C.; MONGET, P.; MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 3-23, 1997.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.25-55.

NILSSON, E.; PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, Gainesville, v. 30, p. 751-762, 1988.

PRATT, S.L.; SPITZER, J.C., BURNS, G.L.; PLYLER, B.B. Luteal function, estrus response, and pregnancy rate after treatment with norgestomet and various dosages

of estradiol valerate in suckled cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2721-2726, 1991.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p. 915-23, 1995.

RICK, G.; HADELER, K.G.; LEMME, E.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age. **Theriogenology**, Gainesville, v. 45, p. 356, 1996.

RIDDELL, M.G.; CARSON, R.L.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; STRINGFELLOW, D.A. Use of exogenous FSH to increase the yield of oocytes collected from aged beef cows: case report. **Theriogenology**, Gainesville, v. 47, p. 162, 1997.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Histórico, avanços e aspectos éticos das técnicas de reprodução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.24, n.1, p.10-17, 2000.

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

RYAN, D.P.; BLAKEWOOD, E.G.; SWANSON, W.F.; RODRIGUEZ, H.; GODKE, R.A. Using hormone-treated pregnant cows as a potential source of oocytes for in vitro fertilization. **Theriogenology**, Gainesville, v. 40, p. 1039-1055, 1993.

RYAN, M.; MIHN, M.; ROCHE, J.F. Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and fate of that follicle wave in postpartum cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Abst. Ser., v.21, p.61, 1998.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.1403-1409, 2001.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 26, p. 141-155, 1998.

SENADA, M.M & BLASCHI, W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. p. 231-237, 2004.

SENEDA, M. M.; RUBIN, K.C.P.; BLASCHI, W.; LISBOA, L.A.; PONTES, J.H.F. Utilização da bomba de infusão contínua para OPU. Use of infusion pump for OPU. Utilización de la bomba de infusión para OPU. **Revista de Educação Continuada**. v. 8, n. 2, p. 168-175, 2005.

SILCOX, R.W.; POWELL, K.L.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and prostaglandin. **Theriogenology**, v.43, p.325 abst., 1995.

SILVA, J.R.V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, v.189, p.113-125, 2006a.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos da fêmea. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.. **Duckes / Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 615-644.

STANISLAUS, D.; PINTER, J.H.; JANOVICH, J.A. et al. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotrofin-releasing hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.144, n.1, p. 1-10, 1998.

THATCHER, W.W.; MACMILLAN, K.L.; HANSEN, P.J.; DROST, M. Concepts for regulations of corpus luteum function in the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v.31, p.149-164, 1989.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p. 172-189, 2003.

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

VAN DER SCHANS, A.; VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J.; DE WIT, A.A.C.; EYESTONE, W.M.; DE BOER, H.A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. **Theriogenology**, n. 35, p. 288, 1991. (Abstract).

VASCONCELOS, J.L.M. Avaliação do protocolo de sincronização de ovulação "Ovsynch" e de fatores relacionados à associação entre produção de leite e taxa de

concepção. Jaboticabal, 1998, 128p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

VIANA J.H.M.; CAMARGO L.S.A.; Sá W.F.; FERNANDES C.A.C.; ARAUJO M.C.C.; MARQUES JÚNIOR A.P. Effect of the presence of non-regressed follicles after oocyte pick-up on follicular dynamics of bos indicus cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 334, 2001.

VIANA J.H.M.; SIQUEIRA L.G.B.; PALHÃO M.P.; CAMARGO L.S.A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae** (Online), v. 38, p. s661-s674, 2010.

WANDJI, S.A.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1034-1041, 1992.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Suppl**, n.61, p.71-90, 2003.

WILTBANK, M.C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Proceedings, annual meeting of the society for theriogenology**. p. 83-97, 1997.

WU, J.; NAYUDU, P.L.; KIESEL, P.S.; MICHELMANN, H.W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicles development in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 320- 327, 2000.

XU, Z; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, 1995.

YAMADA, K.; NAKAO, T.; NAKADA, K.; MATSUDA, G. Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cow. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.27-34, 2002.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S.; LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 55-63, 1998.