

ADRIANA FILÓ DE ALMEIDA VIEIRA

**TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OÓCITOS IMATUROS (TIFOI) E TAXA
DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM VACAS ZEBUÍNAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: **Ciro Alexandre Alves Torres**

Coorientador: **José Domingos Guimarães**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V658t
2022
Vieira, Adriana Filó de Almeida, 1982-
Transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI) e
taxa de recuperação embrionária em vacas zebuínas / Adriana
Filó de Almeida Vieira. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (65 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 52-65.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.200>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Inseminação artificial. 2. Folículo ovariano.
3. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 4. Prostaglandina.
I. Torres, Ciro Alexandre Alves, 1938-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.08245

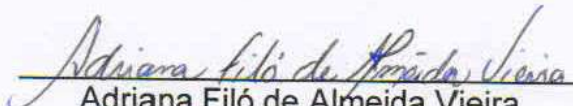
ADRIANA FILÓ DE ALMEIDA VIEIRA


TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OÓCITOS IMATUROS (TIFOI) E TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM VACAS ZEBUÍNAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de dezembro de 2022.

Assentimento:


Adriana Filó de Almeida Vieira
Autora


Ciro Alexandre Alves Torres
Orientador

*Dedico às pessoas que me ajudaram e aos
animais que amo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e proteger durante mais essa etapa vencida na minha vida, e por me fazer sentir sua presença nos momentos que achei que não conseguiria suportar.

Aos meus pais Élcio e Margareth que sempre estiveram por perto me ajudando no que precisei durante essa longa jornada.

Às minhas irmãs Lydiane e Esthéfane pelos momentos de descontração que me tiravam da rotina.

Ao meu marido Susander que me incentivou a trabalhar com as mimosas e com quem aprendi muito.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Departamento de Zootecnia e ao Departamento de Medicina Veterinária da UFV.

À professora Cláudia Sampaio, coordenadora da Unidade de Pesquisa e Extensão em Gado de Corte da UFV UEPE–GC, que cedeu os animais para a realização desse estudo e aos funcionários deste setor Nelson e Norival sempre muito amigos e excelente profissionais.

Agradeço às nelorinhas usadas nos experimentos (Cara Preta, Orelhinha, Claudinha, Azeitona e Perereca), que eram uns amores e sem elas nada disso seria possível.

Ao meu orientador Ciro Torres pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador José Domingos por toda ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Aos graduandos e pós-graduandos que estiveram comigo e me ajudaram na realização dos experimentos e no manejo dos animais.

Aos tratadores Breno e Guilherme que sempre foram muito solícitos e amigos.

Ao professor Romeu Sampaio grande mestre e amigo que sempre vinha me ver.

Agradeço ao Carlão e a Tina da Biotran pela oportunidade do treinamento em seus laboratórios de reprodução, agradeço também à Tochimara e Raisse que me passaram todo conhecimento e onde vi a cena mais linda da vida em uma fertilização *in vitro*: A vida se formando diante dos olhos!

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram a alcançar essa vitória!

Muito Obrigada!

"Saber é Poder"
Francis Bacon

*"Esteja sempre pensando em
como você pode fazer melhor"*
Elon Musk

RESUMO

VIEIRA, Adriana Filó de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI) e Taxa de Recuperação Embrionária em Vacas Zebuínas.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientador: José Domingos Guimarães.

Este trabalho teve por objetivo executar a técnica da Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos, utilizando protocolo de indução de estro com duas doses de prostaglandina, e avaliar sua eficiência na sincronização do estro, ovulação e na produção de embriões. A transferência intrafolicular de oócitos, imaturos (TIFOI) pode ser uma alternativa para obtenção de embriões bovinos, após a superestimulação ovariana (SOV) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). No presente estudo, cinco vacas zebuínas foram utilizadas como doadoras e/ou como ovuladoras. Foram feitas um total de 6 seções completas de Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos-TIFOI de 17 dias (desde o início da sincronização de estro até o lavado de embrião) com protocolo hormonal feito nas vacas ovuladoras de 09 dias com duas aplicações de prostaglandina, sendo 4 seções utilizando oócitos aspirados das doadoras e 2 seções utilizando oócitos de abatedouro. Na 1ª Seção utilizando oócitos aspirados de 3 doadoras, somente uma, de duas vacas ovuladoras produziu 4 embriões (2 Blastocistos e 2 embriões degenerados), de 15 oócitos injetados (26 %). Na 3ª Seção utilizando oócitos aspirados de duas doadoras, foram injetados 12 oócitos em uma ovuladora, produzindo 1 embrião degenerado (de 2 células; 8,33 %). Na 5ª Seção utilizando oócitos de abatedouro, somente uma das cinco vacas ovuladoras, produziu 1 embrião degenerado (mórula) de 18 oócitos injetados (5,5 %). Na 6ª Seção utilizando oócitos de abatedouro, somente uma das cinco vacas ovuladoras produziu 1 embrião degenerado (4 células) de 38 oócitos injetados (2,6 %). Na 2ª e 4ª Seção não houve recuperação embrionária. O protocolo utilizado para a sincronização do estro na transferência intrafolicular de oócitos imaturos se mostrou eficiente (72,2%) na formação de um único folículo dominante e ovulação com formação de corpo lúteo. Houve a produção de embriões por meio da TIFOI, embora com baixa taxa de recuperação embrionária. Portanto há necessidade de novos estudos no intuito de identificar os fatores limitantes desta biotécnica, que pode se tornar uma alternativa para produção de embriões com baixo custo.

Palavras-chave: Folículo. Produção de embrião *in vivo*. Injeção intrafolicular de oócitos.

ABSTRACT

VIEIRA, Adriana Filó de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Transfer Of Immature Oocytes (TIFOI) And Embryonic Recovery Rate In Zebuine Cows.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-adviser: José Domingos Guimarães.

The objective of this work was to perform the technique of Intrafollicular Transfer of Immature Oocytes, using an estrus induction protocol with two doses of prostaglandin, and to evaluate its efficiency in synchronizing and producing embryos. Intrafollicular transfer of immature oocytes (TIFOI) can be an alternative to obtain bovine embryos after ovarian superstimulation (SOV) and *in vitro* embryo production (IVEP). In the present study, five zebu cows were used as donors and/or ovulators. A total of 6 complete sections of Intrafollicular Transfer of Immature Oocytes-TIFOI of 17 days were performed (from the beginning of estrus synchronization to embryo washing) with a hormonal protocol performed in ovulating cows of 09 days with two applications of prostaglandin, with 4 sections using oocytes aspirated from donors and 2 sections using slaughterhouse oocytes. In the 1st Section using aspirated oocytes from 3 donors, only one of two ovulating cows produced 4 embryos (2 blastocysts and 2 degenerated embryos) from 15 injected oocytes (26%). In the 3rd Section, using oocytes aspirated from two donors, 12 oocytes were injected into an ovulator, producing 1 degenerated embryo (2-cell; 8.33%). In the 5th Section using slaughterhouse oocytes, only one of the five ovulating cows produced 1 degenerated embryo (morula) out of 18 injected oocytes (5.5%). In Section 6 using slaughterhouse oocytes, only one of the five ovulating cows produced 1 degenerated embryo (4 cells) out of 38 injected oocytes (2.6%). In the 2nd and 4th Section there was no embryonic recovery. The protocol used for estrus synchronization in the intrafollicular transfer of immature oocytes was efficient (72.2%) in the formation of a single dominant follicle and ovulation with formation of a corpus luteum. There was the production of embryos through TIFOI, although with a low rate of embryonic recovery. Therefore, there is a need for further studies in order to identify the limiting factors of this biotechnique, which will be alternative for the production of embryos at low cost.

Keywords: Follicle. Embryo production *in vivo*. Intrafollicular Injection of immature oocytes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Protocolo de sincronização de estro e ovulação para uso em programa de inseminação artificial em tempo fixo – IATF em bovinos.....36
- Figura 2 – Protocolo de sincronização de estro e ovulação com aplicação de duas doses de Cloprostenol sódico – análogo de PGF2 α para uso em programa de inseminação artificial em tempo fixo.....37
- Figura 3 – Montagem do circuito de injeção dos oócitos na guia de aspiração na TIFOI.....43
- Figura 4 – Envase dos embriões obtidos pela técnica de TIFOI em bovinos.....44
- Figura 5 – Etapas na execução da técnica de TIFOI em bovinos.....45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Diâmetro folicular, número de oócitos injetados (Aspiração Folicular *in vivo* e Aspiração Folicular em ovários de origem abatedouro) no folículo dominante no D9 e número de estruturas recuperadas no lavado uterino no D17, em fêmeas ovuladoras submetidas ao programa da TIFOI.....49
- Tabela 2 - Resposta ao protocolo de indução de estro e ovulação em fêmeas bovinas, submetidas ao protocolo de TIFOI50
- Tabela 3 - Diâmetro folicular e taxa de crescimento do dia 7 a 9 do protocolo de sincronização de estro e ovulação em fêmeas bovinas, submetidas ao programa de TIFOI.....51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Biotécnicas reprodutivas: SOV, PIVE e transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI)	17
2.1.1. SOV (Superestimulação ovariana)	17
2.1.2. PIVE (Produção de embriões in vitro)	18
2.1.3. Transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI)	18
2.1.3.1. OPU (Ovum Pick Up)	19
2.1.3.2. Injeção intrafolicular de oócitos	20
2.1.3.3. Inseminação artificial - IA em protocolo de TIFOI	21
2.1.3.4. Coleta de embriões por lavagem uterina	21
2.2. Fases do ciclo estral em bovinos	22
2.2.1. Dinâmica folicular	24
2.2.2. Emergência folicular ou recrutamento – 1ª fase	25
2.2.3. Fase de seleção folicular e divergência – 2ª fase	26
2.2.4. Fase de dominância folicular – 3ª fase	27
2.2.5. Fase de atresia ou ovulação – 4ª fase	27
2.2.6. Maturação nuclear e citoplasmática (folicular)	28
2.3. Função dos hormônios utilizados na IATF	31
2.3.1. Progestágenos	31
2.3.2. Prostaglandina F2 α	32
2.3.3. Estrógenos	32
2.3.4. Gonadotropina coriônica equina (eCG)	34
2.3.5. GnRh	34
2.4. Sincronização de estro para TIFOI	34
2.4.1. Protocolo utilizado no LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.	36
2.4.2. Protocolo de indução de estro e ovulação com aplicação de duas doses de análogo de PGF2 α	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Período e local do experimento	38
3.2. Animais	38
3.3. Protocolo de indução de estro / ovulação para as vacas ovuladoras	39

3.3.1 Protocolo hormonal de 09 dias com duas aplicações de análogo de prostaglandina e TIFOI:.....	38
3.3.2. Manejo das vacas ovuladoras:	39
3.4.. Obtenção dos oócitos.....	39
3.4.1. Oócitos das vacas doadoras:	39
3.4.2. Oócitos de ovários oriundos de abatedouro:.....	41
3.5. Transferência intrafolicular de oócitos imaturos - TIFOI.....	42
3.5.1. Utilizando vacas doadoras	42
3.5.2. Utilização de oócitos de ovários oriundos de abatedouro	42
3.6. Coleta dos embriões	44
3.7. Esquema representativo da técnica da TIFOI	45
3.8. Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
6. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos animais, são dos mais promissores segmentos da economia nacional. Representam um nicho que é capaz de responder rapidamente a investimentos pontuais. Além disso, o Brasil possui o terceiro maior mercado potencial de carne e leite do mundo. Seguramente os genes serão a moeda forte do futuro (RUMPF et al., 2000). Talvez o que hoje parece utópico do ponto de vista de aplicabilidade, pode se tornar uma realidade amanhã, visto que as biotécnicas são “ferramentas” que podem ser determinantes na relação custo/benefício da multiplicação animal (RUMPF et al., 2000).

Foram feitos poucos testes com outras espécies, havendo relatos de estudos em equinos (HINRICHS; DIGIORGIO, 1991), ovinos (FALCHI et al 2022), humanos (WERNER-VON DER BURG et al., 1993), entre outros, que apresentaram comumente resultados positivos, baixos, e muito variáveis na produção de embriões, havendo necessidade de melhorar a técnica e adaptá-la para as diversas espécies.

Em 2015 foi registrado os primeiros nascimentos de bovinos por meio da técnica de transferência intrafolicular de oócitos (TIFOI) pelos pesquisadores alemães Kassens e colaboradores. Estudos apontaram diferenças entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e que a maioria dessas diferenças se deve ao ambiente de desenvolvimento *in vitro*. Esses estudos curiosamente mostraram que o conteúdo lipídico dos blastocistos produzidos na TIFOI não diferiram totalmente do conteúdo produzido por embriões *in vivo*, enquanto blastocistos derivados da PIVE mostraram acúmulo de gotículas de lipídios significativamente maior em comparação com blastocistos totalmente derivados *in vivo* e os blastocistos derivados da TIFOI. Portanto, os blastocistos da TIFOI apresentaram maiores taxas de sobrevivência após a criopreservação do que os embriões completamente derivados da PIVE (77 v. 10%), o que pode ser atribuído a menor grau de acúmulo de lipídios.

Com isso, utilizaram a transferência intrafolicular de oócitos para permitir o desenvolvimento embrionário precoce dentro do ambiente fisiológico na intenção de se evitar os efeitos nocivos do cultivo *in vitro*. Utilizaram ovários obtidos de abatedouro, de onde aspiraram os oócitos dos folículos de 2 a 8 mm, que foram maturados *in vitro* durante 16 a 22 horas, e logo após os oócitos maturados, foram injetados no folículo pré-ovulatório da fêmea ovuladora. Estes embriões recuperados foram implantados em vacas receptoras (KASSENS et al., 2015).

No Brasil, pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Fazenda Sucupira) em 2016, conseguiram desenvolver a técnica para bovinos e executá-la totalmente *in vivo*, utilizando oócitos imaturos e o processo de injeção intrafolicular com resultado positivo na produção de embriões e de gestações que vieram a termo (SPRICIGO; DODE, 2016).

Essa técnica permite a produção de embriões *in vivo* dentro da propriedade rural com muitas vantagens sobre a fecundação *in vitro* (FIV), sem a necessidade de laboratório, pois a vaca chamada ovuladora é utilizada como se fosse o próprio “laboratório”, dispensando o uso de meios e hormônios em períodos longos de incubação em estufas de CO₂, aliando produtividade, sustentabilidade e economia. Os criadores podem obter os embriões com a mesma rapidez e agilidade da PIVE – em torno de um bezerro por semana a partir de uma única vaca doadora – sem precisar sair de sua fazenda (SPRICIGO; DODE, 2017).

Na transferência intrafolicular, os oócitos são obtidos por meio da aspiração folicular do ovário da doadora ainda imaturos sem protocolo hormonal e após sua classificação, os melhores são injetados no folículo pré-ovulatório da fêmea receptora que é sincronizada por protocolo hormonal, e serão maturados naturalmente. Após a injeção dos oócitos essa fêmea será inseminada. A ovulação ocorrerá, e conseqüentemente, também a fecundação. O lavado uterino dessa vaca ovuladora deve ser feito 8 dias depois da injeção dos oócitos para coleta dos embriões e então serem transferidos individualmente para receptoras de embriões ou podem ser criopreservados (SPRICIGO et al, 2016).

Este trabalho teve por objetivo executar a técnica da transferência intrafolicular de oócitos imaturos, com protocolo de indução de estro utilizando duas doses de Cloprostenol sódico, e avaliar a eficiência na sincronização e na produção de embriões, dado que a taxa de recuperação embrionária por meio dessa técnica nova ainda é baixa.

Sendo a TIFOI uma biotécnica alternativa para produção de embriões, independente de laboratório especializado e com menor custo, as hipóteses deste trabalho foram: Se o protocolo hormonal com duas doses de prostaglandina é eficiente na sincronização das vacas ovuladoras, e se com isso há melhora na taxa de recuperação embrionária, e produção de embriões com boa qualidade como preconiza Spricigo (2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biotécnicas reprodutivas: SOV, PIVE e Transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI)

Atualmente existem duas opções comerciais utilizadas para obtenção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*, que são a SOV (Superovulação de doadoras) e a PIVE (Produção *in vitro* de Embriões), cada uma com suas particularidades. Recentemente surgiu a TIFOI (Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos) relatada por Spricigo et al (2016), que pode ser uma terceira opção para produção de embriões bovinos que associa as vantagens da produção *in vivo* e *in vitro*.

2.1.1. SOV (Superestimulação ovariana)

A fêmea bovina é mono-ovulatória, com isso apenas um oócito é liberado pela ovulação de um folículo durante o ciclo estral. O princípio da técnica de superovulação (SOV) é induzir a ovulação de vários folículos, por meio da aplicação sucessiva de hormônios, que promovem a liberação de vários oócitos, que permitem a fertilização e o desenvolvimento destas estruturas até o estágio de blastocisto. São coletados vários embriões de uma fêmea superovulada, que permite a disseminação de sua genética mais rapidamente do que no caso da inseminação artificial, onde apenas um embrião é formado. Este resultado é alcançado pois não ocorre o fenômeno de dominância folicular, com os estímulos dos hormônios administrados, vários folículos entram em desenvolvimento e chegam a folículos pré-ovulatórios e ovulam sob a ação hormonal (BÓ et al., 2006).

Após o acasalamento ou a inseminação artificial dessa fêmea, os embriões são coletados por meio de lavagem do útero com meios apropriados entre o sexto e o oitavo dia após a inseminação. Nesse período os embriões encontram-se flutuando no fluido uterino, na extremidade dos cornos uterinos, o que facilita a sua captação por meio da técnica de lavagem dos cornos uterinos (DEMÉTRIO, 2003), e em seguida se faz a transferência dos embriões para fêmeas receptoras sincronizadas, para obtenção de gestação, ou estes embriões podem ser criopreservados (SILVA, 2020).

A SOV ainda apresenta grande variação na taxa de ovulação, e na produção de embriões viáveis. Pode haver interferência da idade e do coeficiente de endogamia da doadora, da ordem de coleta, da concentração hormonal e da quantidade de inseminações sobre esses resultados (PEIXOTO et al., 2002). As doadoras selecionadas podem ser superovuladas repetidamente a cada 40 dias, durante um período de 1 a 2 anos, com resultados satisfatórios respeitando estes limites (HASLER, 2003).

2.1.2. PIVE (Produção de embriões *in vitro*)

A PIVE é uma biotécnica de reprodução assistida que consiste na preparação e cultivo de gametas em ambiente laboratorial para obtenção do zigoto, e seu cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado para inovulação ou congelamento. Para a execução da PIVE é necessário uma série de procedimentos integrados e essenciais, que vão desde o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom, procedimentos no laboratório até a transferência dos embriões. Portanto, trata-se de um processo trabalhoso que deve ser feito com rigor, que demanda planejamento e equipe especializada, além de custos mais elevados para se ter melhores resultados na produção de embriões (RIZOS, 2008).

Na realização da PIVE, após a aspiração dos complexos cumulus oócitos (CCOs) de vacas doadoras ou de ovários obtidos de abatedouro, o processo seguinte é todo realizado dentro do laboratório, onde os oócitos são submetidos a maturação (MIV) por até 24 horas e incubados para fecundação (FIV) por 18 a 22 horas. Após esta etapa, o cultivo (CIV) é conduzido por 7 a 9 dias. Todas essas etapas (MIV, FIV e CIV) são realizadas em estufas com temperatura, atmosfera e umidade controladas (FILHO, et al., 2003).

2.1.3. Transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI)

Por meio da técnica de Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos, pesquisadores alemães obtiveram as primeiras gestações que resultaram em nascimento de bovinos em 2015, onde foram utilizados oócitos obtidos em ovários

oriundos de abatedouros, e maturados *in vitro* antes de serem transferidos para o folículo dominante da vaca ovuladora (KASSENS et al., 2015).

Esta técnica foi aprimorada e realizada pela primeira vez no Brasil em 2016 pelo grupo de pesquisadores da “Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia” e deu origem aos primeiros embriões, gestações e nascimentos de bezerros saudáveis, em sistema totalmente *in vivo* que dispensa o uso de laboratório especializado, onde se tornou uma terceira opção para a multiplicação rápida de material genético de qualidade no país (SPRÍCIGO; DODE, 2017).

Na Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos, podem ser utilizados oócitos obtidos de vacas doadoras, ou de ovários de abatedouro. Os oócitos são aspirados dos folículos das vacas doadoras e são selecionados da mesma maneira que na PIVE, mas em vez de maturados em laboratório, são injetados no folículo dominante da vaca ovuladora, a qual foi submetida a um protocolo de sincronização de estro, para que sejam maturados e cultivados *in vivo* pela fêmea ovuladora, aproveitando o seu processo reprodutivo natural. Em seguida é feita a inseminação artificial (IA) dessa fêmea que passa a ser responsável pelas funções fisiológicas de ovulação e fecundação que ocorrem para o desenvolvimento embrionário, até o estágio de blastocisto. Oito dias depois, os embriões que se desenvolveram são coletados por meio de lavagem uterina, os quais podem ser transferidos para as fêmeas receptoras como na transferência convencional de embriões ou podem ser criopreservados (SPRÍCIGO et al., 2016).

2.1.3.1. OPU (Ovum pick up)

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou OPU (Ovum Pick Up) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos de vacas doadoras, para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Esta biotecnologia encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil se destaca em relação a outros países pelo número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica (STROUD e CALLESEN, 2012).

Dados de 2019 relatam o tamanho do mercado brasileiro e a posição relativa do Brasil no cenário mundial como 2º maior produtor de embriões bovinos, com um total de 304.269 embriões gerados e registrados nos segmentos leite e corte (VIANA,

2021), sendo a maior parte dos embriões gerada pelo método de produção *in vitro* (93,8 %) e dados registrados da produção *in vivo* foram de 18.717 embriões (6,2 %), com concentração de 54,4 % no segmento do leite. A criopreservação ainda é mais utilizada em embriões coletados *in vivo* (63,3 %), que naqueles produzidos *in vitro* (40,8 %). Além disso há ainda subnotificações que podem revelar um número ainda maior de embriões produzidos (VIANA, 2021).

Na TIFOI, a aspiração dos oócitos é feita em PBS (Phosphate buffered saline) complementado com 1µL/mL de heparina sódica e 5 % de Soro Fetal Bovino, com temperatura à 36 °C. Durante a aspiração deve ser garantida uma pressão que mantenha o fluxo do líquido de aspiração entre 13-15 mL/min pela bomba de vácuo. São aspirados os folículos entre 3 e 8 mm de diâmetro, levados por um circuito diretamente para um Tubo de Falcon de 50 mL. Em seguida, utilizando um estereomicroscópio é realizado a seleção dos CCOs (*complexos cumulus ovócitos*) aspirados (SPRICIGO et al. 2016).

A aspiração folicular é uma técnica que apresenta grande flexibilidade, pois se consegue obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou até que seja possível a manipulação dos ovários, e também de animais a partir de 2 a 3 semanas após o parto. Na OPU, não se usa tratamento hormonal com gonadotrofinas em vacas doadoras, preservando sua vida reprodutiva, pois esse estímulo hormonal pode causar síndrome do ovário cístico e edema mamário em novilhas jovens (BUENO; BELTRAN, 2008).

2.1.3.2. Injeção intrafolicular de oócitos

Para realizar a injeção intrafolicular dos oócitos imaturos é utilizada uma guia transvaginal acoplada a um mandril, semelhante à utilizada durante a OPU, composto por um sistema fechado, e em uma das extremidades é conectada uma seringa de insulina acoplada para a sucção e injeção dos oócitos e na outra extremidade uma agulha de 27 G (SPRICIGO et al., 2016).

A alocação dos oócitos imaturos para injeção é feita por pressão negativa, no interior da agulha juntamente com o líquido folicular, com um volume total de até 60 µL. Primeiro, o circuito do sistema deve ser completamente preenchido com PBS, contendo uma coluna de ar em torno de 1 cm entre o PBS e o líquido folicular, após isso se faz uma nova coluna com meio PBS contendo os oócitos. Após a colocação

da guia transvaginal, palpar o ovário que contém o folículo dominante e tracionar até a guia. O fórnix e a parede do folículo são perfurados pela agulha, em seguida, os CCOs serão injetados no folículo dominante (SPRICIGO et al., 2016; BARBOSA, 2018).

É necessário o acompanhamento do procedimento por ultrassonografia, visto que os oócitos são ecogênicos, e podem ser observados em movimento dentro do folículo na hora da injeção. Após o procedimento, deverá ser feita a verificação do sistema para se certificar de que todos os oócitos foram injetados (BARBOSA, 2018).

Spricigo et al. (2016) ressalta que é ideal que seja administrado análogo do GnRH no dia 9 (D9 do protocolo de sincronização) na fêmea ovuladora, para assegurar que ocorra a ovulação num prazo médio de 24 a 28 hora horas. Ainda não está preconizada a quantidade ideal de oócitos a serem injetados em cada folículo ovulatório, sendo assim, é recomendado injetar todos os oócitos adquiridos em uma seção de OPU. Spricigo et al. (2016) recomenda a utilização de 25 oócitos em média por folículo dominante. Outros estudos foram realizados com a inoculação de 10, 25 ou 50 oócitos e indicaram que a quantidade de oócitos injetados não afetou a taxa de recuperação embrionária (DIAS, 2021; KASSENS et al., 2015).

2.1.3.3. Inseminação artificial - IA em protocolo de TIFOI

Na transferência intrafolicular de oócitos Imaturos, a IA deve ser realizada logo após a injeção dos oócitos, porém, existem pesquisas sendo realizadas para definir o melhor momento para execução da mesma, pois a técnica é nova e há muito para ser melhorada como ocorreu com as outras biotécnicas reprodutivas. A técnica de inseminação artificial basicamente se resume em descongelar uma palheta de sêmen, montá-la no aplicador, passar o mesmo pela cérvix, e depositar o sêmen no corpo uterino da fêmea, ou de preferência direcionar o aplicador para o corno uterino ipsilateral ao ovário com o folículo dominante. Teoricamente pode-se utilizar o sêmen sexado, mas ainda não se tem dados referentes ao seu uso, sendo utilizado normalmente o sêmen convencional (SPRICIGO et al., 2016).

2.1.3.4. Coleta de embriões por lavagem uterina

Deve ser feito o lavado uterino da vaca ovuladora, após 8 dias da TIFOI. Obrigatoriamente deve-se realizar a avaliação ultrassonográfica para considerar a presença ou não do corpo lúteo, certificando-se da ocorrência da ovulação. Espera-se encontrar nessa fase, os embriões em estágio de blastocisto (SPRICIGO; DODE, 2017).

A coleta de embriões via transcervical é uma técnica prática, asséptica e segura para a doadora, com a menor possibilidade de contaminação. O circuito fechado gera maior pressão no interior do corno uterino que favorece a recuperação embrionária do meio de lavagem infundido para o interior do útero. Neste método é utilizado uma sonda, podendo lavar os dois cornos uterinos de uma só vez, ou fixado na base do corno uterino ipsilateral à presença do corpo lúteo, utilizando meios fisiológicos para o lavado (OLIVEIRA et al., 2014 a; HOELKER et al, 2017).

Para uma interpretação mais precisa na taxa de recuperação deste procedimento, é importante descontar um embrião do total de estruturas recuperadas, pois é possível que um dos embriões ou estrutura recuperada seja proveniente da ovulação do oócito da própria doadora (SPRICIGO et al., 2016).

Entretanto, a produção de embriões por meio da TIFOI tem sido baixa, variando entre as vacas ovuladoras, e com taxas de 10,1; 15,3 e 17,3 % (SPRICIGO et al, 2016; HOELKER et al., 2017; ANDRLIKOVA et al., 2020). Em estudo feito com equinos, obteve-se 5,5 % de recuperação embrionária (DELEUZE, 2009), em humanos, por transferência intrafolicular direta na mesma paciente, 3 oócitos obtidos de aspiração intravaginal foram adicionados em uma preparação de esperma e injetados no folículo dominante, com isso fizeram o primeiro relato de gravidez a partir deste processo em uma mulher que não conseguia engravidar (WERNER-VON DER BURG et al, 1993).

2.2. Fases do ciclo estral em bovinos

O ciclo estral da fêmea bovina é regulado por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotálamo – hipófise - ovário - útero e por mecanismos intra-ováricos que estabelecem uma dinâmica folicular, permitindo o desenvolvimento de um folículo até sua maturação, apto a ovular em momento adequado, um oócito fértil capaz de ser fecundado (CALLEJAS, 2001).

O ciclo estral bovino é definido como o intervalo de estros (período de receptividade sexual), ou intervalo entre ovulações com duração média de 21 dias

(18-24 dias) (FERREIRA, 2010). O ciclo estral é dividido em quatro fases: A 1ª fase é o proestro (ou fase estrogênica) quando ocorre maturação folicular. A 2ª fase é o estro (também é uma fase estrogênica) que é marcada pela manifestação do cio. A 3ª é o metaestro (fase progesterônica) onde ocorre a ovulação e formação do corpo lúteo, e a 4ª fase, o diestro (fase progesterônica), onde há atividade do corpo lúteo e secreção de progesterona (PANSANI et al., 2009; SPINOSA et al., 2017).

O ciclo pode ainda ser dividido em duas fases: a fase folicular ou estrogênica, que se estende do pró-estro ao estro – período compreendido da regressão do corpo lúteo até a ovulação correspondente, e a fase luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro – período que tem seu início a partir da ovulação até a regressão do corpo lúteo (MACMILLAN; BURKE, 1996; FERREIRA, 2010).

O proestro ocorre antes do estro e é a fase de crescimento folicular e regressão ou lise do corpo lúteo do ciclo anterior (declínio da P4) e termina no início do cio. Onde o animal apresenta inquietação, liberação de muco, monta em outros animais, mas não se deixa montar (OLIVEIRA, 2006).

Durante o proestro e estro, ocorre o crescimento folicular na ausência do corpo lúteo funcional, onde há produção de estrógenos pelas células da granulosa ou células foliculares. É a transição que passa do período de dominância progesterônica para um período de dominância estrogênica onde ocorre aumento da concentração de FSH, a concentração sérica de estrógeno e FSH/LH se encontram em elevação, e a concentração de progesterona se torna basal, e então ocorre liberação de GnRH e consequentemente com maior síntese SH/LH, onde suas concentrações aumentam gradativamente estimulando o crescimento folicular, onde ocorre um grande aumento de E2 com pico no início do estro (FERREIRA, 2010).

No estro, a concentração circulante de estrógeno está muito elevada no início, e a fêmea bovina manifesta sinais de inquietação indicativos do comportamento de estro, que são visíveis na maioria das vezes e fica receptiva sexualmente ao macho, mas a ovulação da vaca ocorre por volta de 12 horas após o final do estro (Pode também ocorrer o chamado cio silencioso que por algum motivo de estresse – esse animal não manifesta sintomas comportamentais de cio, mesmo estando no estro) (FERREIRA, 2010 SPINOSA et al, 2017).

O útero sofre influência por diferentes hormônios dependendo da fase do ciclo estral, e os estrógenos são muito importantes para o mecanismo de defesa deste órgão. Durante a fase estrogênica do ciclo estral, ocorre um aumento do fluxo

sanguíneo, da atividade dos leucócitos polimorfonucleares nos órgãos reprodutivos, das contrações miométriais e da produção de muco cervical. Além disso, as concentrações séricas de estradiol antes da ovulação modulam por meio de estímulos celulares, o ambiente uterino adequado em diferentes espécies, desempenhando um papel fundamental na fertilidade. Existem variações nas concentrações de estradiol em diferentes fases do ciclo estral, que afetam a receptividade do útero para a implantação do embrião e a manutenção da gestação (DHALIWAL et al., 2001; GROOTHUIS et al., 2007).

O metaestro é a fase após o estro (24-48h após o início do cio), onde ocorre a ovulação e há a formação do corpo hemorrágico ou corpo lúteo jovem. Pode ser considerada uma fase progesterônica, porque após ocorrer o pico de LH ovulatório, já haverá pequena produção de progesterona. O corpo lúteo na sua fase inicial não responde a prostaglandina pois ainda não possui receptores específicos para esse fim (FERREIRA, 2010).

Já o diestro é a fase em que o corpo lúteo formado na fase anterior produz grande concentração de progesterona, sendo responsivo à prostaglandina, é a chamada fase luteínica. Nesta fase, a concentração sanguínea de progesterona se eleva, baixando a concentração sérica de estrógenos, durando em torno de 16 a 17 dias, terminando com a lise do corpo lúteo pela ação da prostaglandina produzida pelo útero, iniciando assim um novo ciclo (HAFEZ, 1995; SPINOSA et al., 2017).

2.2.1. Dinâmica folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário, é conhecido como dinâmica folicular ovariana, que é regulada por hormônios hipotalâmicos (GnRH), da hipófise (FSH e LH), dos ovários (P4 e E2) e do útero (PGF2 α) os quais envolvem o desenvolvimento sincronizado de vários folículos, denominado onda folicular, variando de uma a quatro ondas por ciclo, sendo mais ocorrente com duas ou três ondas foliculares, além disso, cada onda de crescimento folicular é composta por quatro fases: fase de recrutamento ou emergência, fase de seleção ou divergência, fase de dominância e fase de atresia ou ovulação do folículo dominante (GINTHER et al., 1989; HAFEZ, 1995, GINTHER et al., 1997).

O ciclo estral dos bovinos dura em média 21 dias, com variações de 17 a 24 dias (GINTHER et al., 1996). O número de ondas por ciclo estral pode estar associado com o comprimento do ciclo estral e com a duração da fase luteínica (GINTHER et al., 1989).

Durante cada onda de crescimento folicular, um único folículo "dominante" continua a crescer, enquanto suprime o crescimento de folículos com diâmetros maiores que 4 mm. Embora o crescimento dos folículos com diâmetros superiores a 4 mm dependa do FSH, os folículos antrais maiores (com diâmetros de 7 a 9 mm) passam a depender de LH. A manutenção e a regressão do folículo dominante estão associadas a mudanças nas concentrações de progesterona e hormônio luteinizante. Portanto, pelo menos um folículo grande está presente no ovário bovino durante o ciclo estral, controlando aparentemente o destino dos outros folículos presentes no ovário. Geralmente, apenas um ou dois folículos grandes, que estão próximos da época do estro, atingem o crescimento final até se tornarem folículos maduros ou folículo de Graaf, capazes de ovular (HAFEZ, 1995).

A seleção do folículo dominante coincide com o declínio da onda estimulatória de FSH, e a presença de receptores para LH nas células da granulosa de folículos dominantes, após a divergência folicular, sugere efetiva participação deste hormônio na fase final do desenvolvimento e maturação folicular (FIGUEIREDO et al., 2000).

O folículo dominante (FD) de uma onda tem dois destinos possíveis. Na presença de progesterona acima de 1ng/mL, o FD entra em regressão ou atresia. Quando a concentração de progesterona cai durante e após o processo de luteólise, o FD continua seu crescimento até a ovulação. Se não houver fertilização do oócito ovulado, o ciclo se repetirá (BINELLI et al., 2006).

Após a ovulação, há formação do corpo lúteo, que é uma estrutura glandular transitória e tem como principal função a síntese de progesterona. A progesterona é essencial para a manutenção da gestação (CUNNINGAM, 1999).

2.2.2. Fase de emergência folicular ou recrutamento – 1ª fase

Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos primordiais que são recrutados simultaneamente (emergência folicular) no ovário, e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias, sendo um processo não dependente de hormônios, apesar de que alguns autores discordam e

ainda é motivo de estudos, apesar disso, o aumento transitório de FSH durante o ciclo estral é responsável por estimular o desenvolvimento do folículo antral. Essa dependência hormonal vai ocorrer posteriormente em folículos maiores. Ainda nessa fase, quando os folículos atingem por volta 3 a 4 mm, coincide com a detecção da enzima aromatase nas células da granulosa (GINTHER et al., 2003; FERREIRA, 2010).

2.2.3. Fase de seleção folicular e divergência– 2ª fase

Seleção é o processo durante uma onda folicular, em que alguns folículos vão continuar a crescer, para posteriormente ovular ou entrar em atresia. Neste momento, esses folículos têm em torno de 4 mm de diâmetro, sendo responsivos e dependentes de FSH, que permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular, e com isso também ocorre o aumento gradual sua capacidade esteroidogênica (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 2002; FERREIRA, 2010).

Destes folículos, apenas um continua seu desenvolvimento e se torna um folículo dominante, e os demais também chamados de folículos subordinados, entram em processo de atresia (LUCY et al., 1992), ocorrendo, o fenômeno da divergência folicular. Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo provido pelo hormônio luteinizante - LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2001).

Assim, alguns folículos anteriormente recrutados vão continuar seu crescimento (6 – 10 mm), e o fim dessa fase ocorre com o início da dominância. Após a seleção, ocorre a divergência que é o início da maior diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos da onda folicular, e então um deles vai continuar seu crescimento e se tornar dominante, enquanto os outros folículos iniciam o processo de atresia e são denominados folículos subordinados. Nesse processo, vários fatores intrafoliculares são candidatos à ativação da divergência, tais como o sistema IGF, esteróides ovarianos, peptídeos inibina - A / ativina - A, receptores para gonadotrofinas, fatores angiogênicos e vários outros fatores. Em bovinos as concentrações de IGF-1 livre e estrógeno no fluido folicular, aumentam mais no futuro folículo dominante do que nos folículos subordinados antes do início da divergência (Ferreira, 2010).

2.2.4. Fase de dominância folicular – 3ª fase

A dominância folicular ocorre quando o folículo com maior diâmetro adquire a capacidade de inibir o crescimento dos folículos menores, que são conhecidos como folículos subordinados. Acredita-se que o folículo selecionado para dominância seja o primeiro a desenvolver receptores nas células da granulosa, o que geralmente ocorre quando atinge cerca de 8 a 9 mm de diâmetro. As concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atresia (GINTHER et al., 2001; Ferreira, 2010).

A dominância folicular é estabelecida quando um folículo atinge um tamanho maior do que os demais denominados folículos subordinados. Esse processo começa, quando o folículo dominante apresenta diâmetro maior em cerca de 1 a 2 mm em relação ao segundo maior folículo da onda folicular, cessando o crescimento dos folículos subordinados. A perda da dominância do folículo dominante marca o fim da onda folicular atual e o início da próxima (Ferreira, 2010).

Além do LH, outros fatores, como o IGF-1 e o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), também podem contribuir para reforçar a dominância. O IGF-1, por exemplo, pode mediar parcialmente a indução de receptores de LH, enquanto o VEGF estimula a angiogênese. O folículo dominante é muito sensível ao LH, e o aumento na produção de progesterona pelo corpo lúteo reduz em cerca de 50 % a frequência do LH, o que pode provocar a atresia do folículo dominante e o surgimento de uma nova onda folicular (Ferreira, 2010).

A medida do diâmetro do folículo pré ovulatório encontra-se em torno de 10 a 12 mm nas fêmeas zebuínas (BORGES et al., 2003), enquanto nas fêmeas taurinas diâmetro do folículo pré ovulatório alcança de 15 a 20 mm (WOLFENSON et al., 2004).

2.2.5. Fase de atresia ou ovulação – 4ª fase

Durante o ciclo estral, ocorrem normalmente duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas, sendo apenas a última, a onda ovulatória. Mas somente quando o folículo dominante está presente no momento da regressão luteínica, é que acontecerá a ovulação (ADAMS; PIERSON, 1995).

Quando há a presença de um corpo lúteo (CL) funcional no ovário, com ampla produção de progesterona. Este hormônio exerce um efeito de retro - alimentação negativa (feed back negativo) no eixo sistema nervoso central - hipotálamo - hipófise

- ovário, que mantém a amplitude e frequência dos pulsos de LH, ainda baixos, inviabilizando os processos de maturação final do folículo e ovulação. O folículo dominante torna-se anovulatório (GINTHER et al., 1996).

Já o crescimento do folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona promove o aumento da concentração de estrógeno, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva (feedback positivo) para a secreção do GnRH e o consequente pico de LH. Em resposta ao LH, o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir estrógeno e inibina aumenta, tornando-se dominante. Tal fato leva a queda das concentrações de FSH a concentrações basais, e posteriormente ocorrerá a ovulação (FORTUNE, 1993, GINTHER et al., 1999).

O folículo ovulado passa por mudanças funcionais e estruturais para dar origem ao corpo lúteo (CL). O CL desenvolve-se rapidamente, secretando quantidades crescentes de progesterona. Não havendo prenhes, entre os dias 16-18, ocorre o processo de luteólise com a regressão do CL e consequente queda das concentrações plasmáticas de progesterona (ADAMS, 1995; BO et al. 1995; FORTUNE et al., 2004).

2.2.6 Maturação nuclear e citoplasmática (folicular)

A produção bem-sucedida de embriões depende de diversos fatores, incluindo os processos de maturação e fecundação de oócitos. Esses eventos são fundamentais para garantir a eficácia das técnicas de biotecnologia reprodutiva. Além disso, a qualidade dos oócitos, o tempo e o meio de maturação também têm um papel significativo na fertilização e no desenvolvimento embrionário. É necessário, portanto, levar em consideração esses aspectos para otimizar os resultados dessas técnicas (RIZOS et al., 2002; DALE, DEFELICE, 2011; DEMYDA-PEYRAS, 2013).

A TIFOI seria uma das alternativas para se obter melhores resultados quanto à maturação oocitária, proporcionando um ambiente de maturação *in vivo*, eliminando os problemas que podem ocorrer na MIV, sendo uma condição de ambiente folicular natural e em condições ideais para a maturação (SPRÍCIGO et al., 2016; HOELKER et al., 2017).

O estágio fisiológico do folículo do qual os oócitos são retirados, influencia no desenvolvimento oocitário após a saída destes do ambiente folicular e isso deve ser levado em conta (WRENZYCKI, 2018).

Antes de chegarem à fase de diplóteno, os oócitos passam por três estágios da prófase I da meiose: leptóteno, zigóteno e paquíteno (PICTON et al., 1998).

Os oócitos ficam retidos na fase de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica, até que os folículos em que estão contidos entrem em atresia ou até que o folículo dominante, em resposta ao hormônio luteinizante (LH), permita que o oócito complete a meiose. Isso resulta na formação de uma célula haplóide, que é capaz de ser fecundada e gerar um embrião, processo que ocorre na maioria dos mamíferos (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005; SÁNCHEZ, SMITZ, 2012).

Durante o período da onda de LH e a ovulação, o oócito passa por uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas, concomitantes ao seu crescimento (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005; SÁNCHEZ, SMITZ, 2012).

A competência do oócito em retomar a meiose é um fator importante para o sucesso do desenvolvimento embrionário, e pode ser classificado em competente ou incompetente. O oócito competente é capaz de sustentar todo o desenvolvimento embrionário, e a competência meiótica é adquirida durante a foliculogênese, coincidindo com a formação do antro folicular (ARLOTTO et al., 1996; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

A maturação citoplasmática é um fator importante para o sucesso dos processos de maturação, independentemente da maturação nuclear. A capacidade dos oócitos em completar a sua maturação citoplasmática está intimamente ligada aos processos normais do desenvolvimento oocitário. Os oócitos que não conseguem completar adequadamente a maturação citoplasmática não são capazes de completar os processos normais de desenvolvimento (KRISHER et al., 2004).

In vivo, a retomada da meiose é iniciada pela onda pré-ovulatória de LH, acontecendo somente em oócitos meioticamente competentes originados de folículos dominantes. Antes e durante a onda de LH, o oócito é envolvido pelas células compactas do cúmulus. Pouco antes da onda de LH, as junções gap entre as células do cúmulus e do oócito se desfazem (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

A maturação oocitária e a ovulação são dependentes da secreção de LH e da ativação de seus receptores. A ausência desses fatores pode resultar na falha da maturação e ovulação do oócito. Quando não há receptor de LH detectado nos

oócitos, os sinais que desencadeiam a maturação oocitária são provenientes das células foliculares que o rodeiam (PENG et al., 1991, VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os folículos respondem à onda de LH mudando a produção de esteróides pelas células da granulosa e as células do cúmulus produzem ácido hialurônico, o que leva à mucificação e expansão das células do cúmulus e ao rompimento das junções comunicantes entre essas células e o oócito. O ambiente folicular de predominância estrogênica agora passa a ter predominância progesterônica (PICTON et al., 1998).

Durante a maturação nuclear do oócito, é importante que ele tenha a habilidade de retomar a meiose e alcançar o estágio de metáfase II, que pode ser identificado pela extrusão do segundo corpúsculo polar e pela formação da segunda placa metafásica (WATSON, 2007; BLANCO et al., 2011).

A resposta ao pico de LH que desencadeia esse processo é regulada por diversas vias moleculares, incluindo a alteração na fosforilação de proteínas, a presença do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e as concentrações de cálcio. (BORNSLAEGGER et al., 1986; HOMA, 1995; GORDO et al., 2001).

O aumento de cAMP no oócito de mamíferos é de grande importância para a maturação meiótica, já que promove a continuação da meiose. Quando o cAMP está alto, o oócito permanece na prófase I da meiose. No entanto, quando ocorre queda de cAMP, a meiose é reiniciada e o oócito começa a progredir na prófase I e na metáfase II, resultando na extrusão do segundo corpúsculo polar (CONTI et al., 1998).

Portanto, o rompimento das junções gap entre as células do cúmulus e o oócito, induzida pelo LH, pode ser responsável pelo início da retomada da meiose, pois impede o fornecimento de cAMP das células da granulosa para o oócito, o que leva à diminuição de cAMP dentro do oócito (CARABATSOS et al., 2000).

Quando os oócitos são retirados do ambiente folicular por meio da OPU, perdem a ação do GMPc folicular, que leva a rápida ativação da PDE3A (fosfatidilesterase 3A) do oócito e ao decréscimo da concentração citoplasmática de AMPc, com isso ocorre a ativação da PKA (proteína quinase A), perda das junções gap, parada na transcrição e retomada espontânea da meiose (TRIPATHI et al., 2010).

A capacidade do oócito de se desenvolver está diretamente relacionada à sua maturação citoplasmática, que se refere à habilidade do oócito de ser fertilizado e torna-se embrião saudável capaz de se desenvolver até o nascimento. Essa

competência de desenvolvimento é adquirida após o oócito se tornar meioticamente competente (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

As mitocôndrias têm a capacidade de produzir a maior parte da energia celular em forma de ATP por meio de fosforilação oxidativa do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos do citoplasma. Nos oócitos, é comum encontrar alta concentração de mitocôndrias para suportar a taxa elevada de síntese de moléculas durante os processos fisiológicos de maturação e divisão celular (WILDING et al., 2001). O bloqueio do desenvolvimento embrionário ou desenvolvimento anormal pode estar relacionado com a incapacidade das mitocôndrias em aumentar e/ou acumular ATP. (STEUERWALD et al., 2000).

A maturação citoplasmática do oócito também é importante para que ele bloqueie a polispermia, descondense o espermatozóide que conseguiu penetrar o oócito e na formação do pronúcleo após a fertilização (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

2.3. Função dos hormônios utilizados na IATF

2.3.1. Progestágenos

Substâncias farmacológicas com efeitos similares a progesterona são chamadas de progestágenos. São utilizados com o objetivo de simular uma fase luteal por períodos que permitam a regressão espontânea do CL, o que leva a sincronização do estro de aproximadamente entre 48 e 96 horas após a remoção do agente progestacional (RATHBONE et al., 2001).

A liberação de LH pela hipófise é primariamente controlada pela progesterona e pelo estradiol (E2) (KINDER et al., 1996). No início da fase luteal, compreendendo de 2 a 3 dias após a ovulação, quando o CL ainda não está completamente formado, as concentrações de progesterona são menores e os pulsos de LH ocorrem com frequência maior do que normalmente ocorre no meio da fase luteal (PETERS et al., 2000).

O mesmo ocorre após a luteólise, quando há maior concentração e frequência dos pulsos de LH, em consequência de uma concentração de progesterona circulante mais baixa. A progesterona inibe o estro, a ovulação e altera a dinâmica folicular, pois atua sobre o hipotálamo que regula a liberação de GnRH e também de LH (PETERS et al., 2000).

A administração de progesterona tem efeitos biológicos semelhantes aos produzidos naturalmente. Entre esses efeitos, destacam-se a supressão do estro, a inibição do pico pré-ovulatório de LH, que simula a fase luteínica do ciclo estral, e a regulação da secreção pulsátil de LH, levando à ocorrência das ondas foliculares e ao desenvolvimento dos folículos (LARSON; BALL, 1992).

2.3.2. Prostaglandina F2 α

A PGF2 α é sintetizada principalmente no útero, e também pelo próprio CL na sua fase final, que age provocando a luteólise. A PGF2 α promove uma vasoconstrição seguida de uma cascata apoptótica do CL. Após sua descoberta, esta substância foi modificada e deu origem aos seus análogos (Dinoprost trometamina, cloprostenol sódico, alfoprostol, fenprostalene, luprostiol e tiaprost) (LOPEZ, 2005).

O sucesso da sincronização do estro com PGF2 α depende da presença de um CL, visto que, sua ação é desencadear a regressão morfológica e funcional dessa estrutura. A resposta eficiente de luteólise acontece dependendo da maturidade do CL no momento da aplicação da PGF2 α . Assim, a PGF2 α não induz efetivamente a luteólise durante os primeiros 5 ou 6 dias após o estro (RATHBONE et al., 2001), pois antes deste período o CL não possui receptores para a ação da PGF2 α .

Foram feitos estudos com a prostaglandina F2 α visando diferentes efeitos além da luteólise, demonstrando que a PGF2 α pode atuar na liberação do hormônio LH, importante para o desenvolvimento folicular. Estes estudos verificaram que a PGF2 α pode atuar como estimulador da ovulação em novilhas pré-púberes (LEONARDI et al., 2012; PFEIFER et al., 2014). Adicionalmente, PGF2 α atua auxiliando na liberação de LH em vacas de corte.

O mecanismo pelo qual a PGF2 α atua como indutor da ovulação não é totalmente compreendido, mas provavelmente atua de forma sistêmica, no eixo hipotálamo-hipófise para aumentar a resposta hipofisária ao GnRH e estimular a liberação de LH (RANDEL et al., 1996), e em vacas de corte em anestro (CRUZ et al., 1997), ovelhas (CARLSON et al., 1973) e ratos (WARBERG et al., 1976).

2.3.3. Estrógenos

A concentração de 17β estradiol flutua durante o ciclo estral, com isso este hormônio exerce importante influência na dinâmica folicular e na atividade folicular. O estrógeno atua nos vasos sanguíneos, crescimento glandular e crescimento epitelial, que prepara a fêmea para a receptividade sexual. Quando ocorre alta concentração de estradiol, o comportamento da fêmea é altamente influenciado para eventos copulatórios (GINTHER et al., 1999).

A aplicação de estrógenos causa inicialmente, supressão na secreção tanto de FSH quanto de LH (MARTINEZ et al., 2003) levando à atresia dos folículos. Seguindo a liberação de pico de FSH e, conseqüentemente, o recrutamento de nova onda folicular (BINELLI et al., 2006).

O intervalo da aplicação do estrógeno até o recrutamento da nova onda depende da dose administrada e qual estrógeno utilizado, variando em torno de 36 a 72 horas (MARTINEZ et al., 2005). O desenvolvimento de nova onda folicular ocorre em torno de quatro dias após a aplicação do estrógeno e depende do reaparecimento do pico de FSH (BO et al., 1993). Na ausência da ação da progesterona, o estrógeno vai induzir a liberação de GnRH e LH e a ovulação do FD ocorrerá em 36 a 72 horas, dependendo do estrógeno empregado pela variação do seu tempo de ação (RATHBONE et al., 2001).

Para a sincronização do estro são utilizados diferentes ésteres de estrógeno, normalmente em soluções injetáveis, como o valerato de estradiol, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e 17β estradiol (BO et al., 1994; MURRAY et al., 1998). Cada um deles apresenta um metabolismo diferente, portanto há variação da duração da meia vida após a sua aplicação dependendo da dose e do estrógeno escolhido. Estas diferenças promovem mudanças referentes ao protocolo de sincronização estabelecido (LOPES, 2005), por exemplo, uma única injeção de valerato de estradiol (5 mg) resultou em concentrações plasmáticas elevadas de estradiol de 5 a 7 dias (BO et al., 1993), enquanto uma única injeção de 17β estradiol (5 mg) resultou em concentrações plasmáticas elevadas de estradiol que duraram apenas 42 horas (BO et al., 1994).

Já a utilização do benzoato de estradiol, 24h após a remoção do implante intravaginal de progesterona, induziu o pico de LH em 16h, e as ovulações se deram em 40 h após a sua administração (HANLON et al., 1997). A utilização do cipionato de estradiol na remoção do implante intravaginal de progesterona resultou em pico de LH e ovulação 38 e 66 h após, respectivamente (AMBROSE et al., 2001). Nos estudos

de Crepaldi (2009) foi verificado a ocorrência da ovulação sincronizada, em cerca de 72 h após a administração do cipionato de estradiol, feita no dia da remoção do implante intravaginal de progesterona, que promoveu resultado semelhante ao protocolo em que se empregou o benzoato de estradiol 24 h após a remoção do dispositivo de progesterona. Nos programas de IATF, o BE e o CE são os estrógenos mais utilizados.

2.3.4. Gonadotropina coriônica equina (eCG)

O eCG possui atividade semelhante às ações de FSH e LH, assim, é capaz de promover o crescimento de um ou vários folículos quando administrado, dependendo da dose e fase do crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2004a). O eCG administrado no final da fase de crescimento do folículo dominante, tem capacidade de induzir a ovulação e/ou luteinização devido sua atividade semelhante à ação do LH (BARUSELLI et al., 2004c). Possuindo ação folículo estimulante e luteinizante (MURPHY; MARTINUK, 1991), tem capacidade de aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona, principalmente quando é administrado após a fase de divergência folicular. Com isso, ocorre aumento da taxa de crescimento folicular, culminando com maior folículo dominante e, conseqüentemente, maior CL, que pode resultar em aumento na taxa de concepção e de prenhez, em relação às fêmeas que não foram tratadas com eCG (BARUSELLI et al., 2003).

2.3.5. GnRh

O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) é um hormônio que estimula a liberação de FSH (hormônio folículo-estimulante) e de LH (hormônio luteinizante). A aplicação de GnRH no momento da IATF melhora a sincronização da ovulação e as taxas de prenhez (SÁ FILHO et al., 2010a).

Existem diferentes tipos de análogos de GnRH disponíveis no mercado veterinário, incluindo formas sintéticas e semelhantes ao endógeno. Essas moléculas têm ações distintas. A gonadorelina é uma forma sintética de curta ação, enquanto os análogos sintéticos de curta ação incluem a buserelina e a lecirelina (PICARD-HAGEN et al., 2015; ROMAGNOLI et al, 2009).

2.4. Sincronização de estro para TIFOI

Na IATF em bovinos de corte, os protocolos mais comuns utilizados são baseados na utilização de hormônios como estradiol, GnRH e PGF2 α , também incluem o uso de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona. As taxas de concepção apresentadas com utilização desses protocolos têm sido entre 40 e 50 %, variando de 27,8 a 75 % (BO et al., 2002; BO et al., 2007).

O protocolo mais utilizado inicia-se basicamente com inserção intravaginal de progesterona e aplicação de benzoato de estradiol (BE) que promovem a regressão dos folículos e iniciam nova onda de crescimento folicular. Outros hormônios também são utilizados para sincronização do estro: são os análogos de Prostaglandina (PGF2 α) para induzir a luteólise, e o éster de estradiol (benzoato ou cipionato de estradiol) ou análogos de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) para induzir a ovulação e são modificados de acordo com o objetivo do protocolo (PFEIFER et al., 2014). Também pode ser utilizado o eCG (gonadotrofina coriônica equina) que tem ação de FSH e LH e seu uso é indicado para rebanhos com baixa ciclicidade, e vacas magras (BARUSELLI et al., 2004b).

De acordo com as pesquisas de Stewart e Allen (1981) e Baruselli et al. (2008), o eCG é capaz de estimular o crescimento, maturação folicular e ovulação quando se liga aos receptores de FSH e LH do folículo. Além disso, Souza et al. (2009) destacam que o eCG também pode se ligar aos receptores de LH do corpo lúteo, promovendo o aumento das células luteais grandes, responsáveis por cerca de 80 % da síntese de progesterona, o que aumenta a capacidade de produção dessa substância. O uso do eCG como uma ferramenta potencial para melhorar as concentrações plasmáticas de progesterona em ciclos estrais subsequentes tem sido sugerido por alguns autores (Baruselli et al., 2000).

Para melhorar os índices de fertilidade, o tratamento com eCG no momento da retirada do implante de progesterona tem sido utilizado para mudanças no padrão de crescimento folicular e na função do corpo lúteo (BARUSELLI et al., 2004b; SOUZA et al., 2009). Segundo Sá Filho et al. (2010c) a melhora na fertilidade de vacas tratadas com essa gonadotrofina pode ser explicada por três efeitos: a eCG pode aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da IATF, melhorar a taxa de ovulação e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteal subsequente.

2.4.1. Protocolo utilizado no LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Protocolo com associação entre benzoato de estradiol e progesterona. Inserção de um dispositivo contendo progestágeno (implante) e administração de benzoato de estradiol no dia 0 (D0) para iniciar o crescimento de nova onda folicular. A administração do análogo de prostaglandina é feita no dia da retirada do dispositivo de progesterona nos dias 7, 8 ou 9 (dependendo do manejo da propriedade) para induzir a luteólise e reduzir a concentração de progesterona circulante. Após 24 horas é realizada a administração de benzoato de estradiol para a sincronização da ovulação (que induz um pico de LH via feedback positivo pré-ovulatório ao GnRH, e a TIFOI é realizada 30-36 horas após esta aplicação. Utilizando esse protocolo, a TIFOI é realizada entre 52 a 54 horas após a retirada do implante de progesterona, e a ovulação ocorrerá em aproximadamente 15 a 18 horas após a TIFOI (aproximadamente 65 horas após a retirada do implante; figura 1). A utilização de protocolos diferentes pode ser aplicada, porém requer novas avaliações, com o acompanhamento do momento da ovulação (SPRICIGO; DODE, 2017).



Figura 1: Protocolo de sincronização de estro e ovulação para uso em programa de inseminação artificial em tempo fixo – IATF em bovinos

2.4.2. Protocolo de indução de estro e ovulação com aplicação de duas doses de análogo de PGF2 α

Inserção de um dispositivo contendo progestágeno (implante intravaginal) e administração de benzoato de estradiol no dia 0 (D0) para iniciar o crescimento de

uma nova onda folicular. A 1ª administração de análogo de PGF2 α é feita no 5º dia (D5) para induzir a luteólise na presença de um corpo lúteo (LAUDERDALE, 1975). No 7º dia (D7) se faz a retirada do dispositivo de progesterona e 2ª aplicação de análogo de PGF2 α para aumentar a indução da luteólise se o corpo lúteo não tiver sido responsivo na 1ª aplicação e garantir a queda da concentração de progesterona, possibilitando que ocorra o feedback positivo, com aumento e liberação de GnRH e consequentemente síntese e liberação de LH (RANDEL et al., 1996), e também aplicação de eCG para favorecer o crescimento folicular, visto que este tem ação de FSH e LH (BARUSELLI et al., 2004b). Após 24 horas, no 8º dia (D8) é realizada a administração de benzoato de estradiol para a sincronização da ovulação (induzindo um pico de LH via feedback positivo pré-ovulatório ao GnRH). A TIFOI é realizada no 9º dia (D9), 30-36 horas após a aplicação do benzoato de estradiol, também no D9, será feita a aplicação de GnRh para aumentar a probabilidade da ovulação, pois atua diretamente na hipófise, liberando um pico de LH, causando ovulação ou luteinização do folículo dominante presente no momento da aplicação (MACMILLAN e THACTHER, 1991). Utilizando esse protocolo, a TIFOI é realizada entre 52 a 54 horas após a retirada do implante de progesterona, e a ovulação ocorrerá em aproximadamente 15 a 18 horas após a TIFOI (aproximadamente 65 horas após a retirada do implante), sendo corroborados com os estudos realizados por SPRICIGO e DODE (2017). No D10 é feita avaliação por meio de ultrassonografia e se a vaca não tiver ovulado, é inseminada novamente (Figura 2).

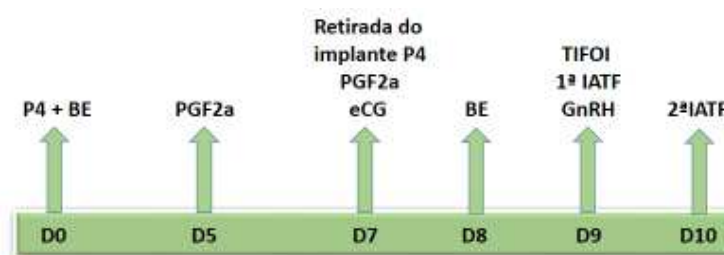


Figura 2: Protocolo de sincronização de estro e ovulação com aplicação de duas doses de Cloprostenol sódico - análogo de PGF $_{2\alpha}$ para uso em programa de inseminação artificial em tempo fixo-IATF em bovinos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Período e local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, no período de 07/05/2021 a 07/03/2022. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais de Produção, processo n. 50553477967, no dia 24 de agosto de 2022.

3.2. Animais

Cinco vacas zebuínas, com idade média de 4 anos, pluríparas e cíclicas não lactantes com escore corporal entre 2,5 e 3,5 na escala de 1 a 5 (DIAS,1991), foram manejadas em piquetes com pastagem predominantemente de *Brachiara decumbens* (2 animais hectare/ano), sal mineral e água de forma *ad libitum*, e submetidas ao programa sanitário convencional, com vacinações obrigatórias, antiparasitários internos e externos e vacinas reprodutivas. As cinco fêmeas utilizadas no experimento foram cedidas pela UEPE – GC (Unidade de Pesquisa e Extensão em Gado de Corte da UFV). Na execução das etapas experimentais, as manipulações dos animais foram feitas em troncos de contenção e balança individual.

3.3. Protocolo de indução de estro/ovulação para as vacas ovuladoras

As vacas doadoras de oócitos não foram protocoladas.

3.3.1 Protocolo hormonal de 09 dias com duas aplicações de análogo de prostaglandina e TIFOI:

D0 – Implante progesterona monodose 0,5 g (Primer®, Tecnopec) + 2 mg benzoato de estradiol (Ric Be®, Tecnopec / Agener União).

D5 – 0,5 mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec / Agener União).

D7 – Retirada do implante de progesterona (Primer®, Tecnopec) + 200 U.I.

Gonadotrofina Coriônica Equina -eCG (Ecegon® 5.000 UI, Biogénesis Bagó) + 0,5 mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec / Agener União).

D8 – 1 mg de benzoato de estradiol (Ric Be®, Tecnopec / Agener União).

D9 – Aspiração folicular das vacas doadoras de oócitos ou aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro, seleção de oócitos, TIFOI, observar cio, 1^a inseminação artificial e aplicação de 25 ug de Hormônio Liberador de Gonadotrofina - GnRH (Tecrelin®, Tecnopec / Agener União).

D10 – Confirmar ovulação – 2^a IA se não tiver ovulado (acompanhamento com avaliação ultrassonográfica 12 e 24 horas após a 1^a IA)

D17 – Lavado uterino – 8 dias após a 1^a IA + 0,5 mg de Cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec / Agener União).

3.3.2. Manejo das vacas ovuladoras:

As vacas foram conduzidas e contidas em brete de contenção para aplicação dos hormônios nos dias estipulados do protocolo, avaliadas por ultrassonografia transretal com ultrassom (Mindray® DP 2200), acompanhando desenvolvimento do folículo pré ovulatório de cada animal, onde no dia do estro, foram injetados os oócitos selecionados. Imediatamente após a injeção dos oócitos, realizou-se a 1^a inseminação artificial (com sêmen convencional de mesmo touro e mesma partida, congelado / descongelado de aquisição comercial), e posteriormente 12 e 24 horas avaliadas por exame ultrassonográfico transretal para verificar a ocorrência da ovulação. No oitavo dias após a primeira inseminação artificial, realizou-se o lavado uterino empregando o sistema fechado, com sonda de Folley nº 22 (Solidor® 2 vias), filtro coletor para embriões com malha de 80 µc (WTA®) e solução de ringer lactato (Fresenius®) acrescido de 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®). Foram feitos três lavados consecutivos com volume de 150-200 mL de solução por animal. Posteriormente, o lavado obtido foi colocado em placa de Petri 60x15 mm de diâmetro (Firstlab®) e as estruturas (oócitos, embriões) rastreadas em estereomicroscópio (Olympus®) com aumento de 40 X. Os embriões obtidos foram classificados quanto a sua qualidade de acordo com os padrões preconizados pela IETS (2013). Posteriormente os embriões foram envasados em palhetas finas de 0,25 mL (IMV®) e emergidas em nitrogênio líquido e estocados para estudos de expressão gênica a posteriori.

3.4. Obtenção dos oócitos

3.4.1. Oócitos das vacas doadoras:

As vacas escolhidas como doadoras, não foram protocoladas hormonalmente, e passaram por aspiração folicular guiada por ultrassom no dia da TIFOI.

Individualmente as vacas foram contidas em brete apropriado e após higienização, foram anestesiadas com injeção espinhal peridural intercoccígea (espaço entre a primeira e a segunda vértebras intercoccígeas – C1 e C2), contendo 60 mg de Cloridrato de lidocaína (Lidovet®, Bravet) (MASSONE, 2003). Posteriormente, fazia-se a higienização ao redor do ânus e vulva com solução a 10 L de água crescida de 10 mL de solução desinfetante (CB30 TA®, Ouro Fino) e secagem com papel toalha.

Os oócitos foram aspirados utilizando guia de aspiração folicular (WTA®) com probe microconvexa de 5 a 8MHz (Mindray®), circuito de aspiração e agulha apropriada para aspiração, 20 G (WTA®), utilizando solução Ringer com lactato (Fresenius®) acrescido de 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®) e 0,02 % de Heparina (Hepamax-s® 5.000ui), na pressão de 80 mm/hg por meio de uma bomba de vácuo (WTA®) para um tubo Falcon de 50 mL (Kasvi®) por animal. Posteriormente, o conteúdo aspirado era filtrado mini filtro com malha de 80 µc (WTA®) acoplado em outro tubo de Falcon (Kasvi®), o filtro então foi lavado em uma placa de Petri 60 mm de diâmetro (Firstlab®) e as estruturas rastreadas em estereomicroscópio (Olympus®) com aumento de 40 X.

Os oócitos foram avaliados e classificados numa escala de 1 a 4 como preconizados por Leibfried, Fisrt (1979). Foram empregados neste estudo somente oócitos classificados em graus 1 e 2 de qualidade (com células do cumulus, compacto com 2 a 5 camadas ou mais e com citoplasma homogêneo). Os oócitos selecionados foram colocados em placa de Petri estéril 60 mm (Firstlab®) contendo gotas de 0,2 mL de meio de PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato - (DMPBS® - Dulbecco - Biodux) + 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®), e identificadas na própria placa de Petri para cada vaca ovuladora.

Para realizar a injeção de oócitos intrafolicular (TIFOI), empregou-se a mesma guia de aspiração (WTA®), porém, no final da guia e no final do circuito, após o preenchimento de todo o circuito com a mesma solução de PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato - (DMPBS® - Dulbecco - Biodux), acoplou-se uma seringa de 5 mL, onde foi possível fazer uma câmara de ar de 0,2 mL entre a solução do

circuito e a gota com 0,2 mL da solução PBS e BSA com os oócitos selecionados na placa de Petri. Então o circuito foi levado ao tronco onde a receptora estava contida, foi introduzido na guia de aspiração (WTA®) e após o posicionamento do folículo pré-ovulatório no ponto de saída da agulha na tela do ultrassom, a agulha foi introduzida no folículo e a aplicação de 0,2 mL de solução com os oócitos foi injetada dentro do folículo.

Posteriormente o animal foi liberado do tronco e avaliado 12 e 24 horas por meio de exame ultrassonográfico (Mindray® DP 2200) para a confirmação da ovulação.

3.4.2. Oócitos de ovários oriundos de abatedouro:

Os ovários coletados no abatedouro foram mantidos em solução salina a 0,9 % de NaCl (Soro Fisiológico Cloreto de Sódio 0,9%® - Beker) aquecida a 37 °C, acondicionados em garrafa térmica, e transportados em até 2 horas após a coleta ao Laboratório de Reprodução no D9 do protocolo.

No laboratório, os folículos dos ovários foram aspirados, por meio de seringa de 10 mL acoplada com agulha 40x12 e o líquido folicular aspirado foi colocado em tubo Falcon de 50 mL (Kasvi®). Posteriormente, após a sedimentação (20 a 30 minutos) o conteúdo do tubo Falcon de 50 mL (Kasvi®) foi colocado em placa de Petri estéril 60 mm de diâmetro (Firstlab®) para rastreamento dos oócitos com auxílio de estereomicroscópio (Olympus®) em aumento de 40 X somente oócitos de grau 1 e 2 (com células do cumulus, compacto com duas a cinco camadas ou mais e com citoplasma homogêneo).

Estes oócitos foram coletados com pipeta automática 20 µL (Firstlab®) com ponteira estéril 20 µL (Olen®) e colocados em placa de Petri estéril 60 mm de diâmetro (Firstlab®) contendo gotas de meio de lavagem PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato - (DMPBS® - Dulbecco - Biodux) + 0,4% de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®), e identificadas na própria placa de Petri para cada vaca ovuladora para a montagem da guia para a TIFOI. Para realizar a injeção dos oócitos intrafolicular, realizou-se o mesmo procedimento descrito no item anterior, para oócitos aspirados em vacas doadoras.

3.5. Transferência intrafolicular de oócitos imaturos - TIFOI

3.5.1. Utilizando vacas doadoras

Foram feitos quatro protocolos de 9 dias com duas aplicações de Prostaglandina F2 α (Estron®, Tecnopec / Agener União). Como havia somente cinco animais no experimento, por protocolo, foram aspiradas três vacas **doadoras** e foram utilizadas duas vacas como **ovuladoras**. Os oócitos aspirados foram divididos para as duas vacas ovuladoras ou injetados em uma, quando na coleta se recuperava poucos oócitos. Os folículos pré ovulatórios foram mensurados no D7 e D9 e 12 e 24 horas após a TIFOI até a verificação da ovulação e formação de corpo lúteo no D17. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas com auxílio de ultrassom (Mindray® DP 2200).

3.5.2. Utilização de oócitos de ovários oriundos de abatedouro

Foram feitos dois protocolos de 9 dias com duas aplicações de Prostaglandina F2 α (Estron®, Tecnopec / Agener União) utilizando oócitos de ovários oriundos de abatedouros. Todas as cinco vacas foram utilizadas como ovuladoras e todas foram protocoladas.

Para a TIFOI, os oócitos selecionados e identificados, foram aspirados e divididos pela quantidade de vacas ovuladoras aptas para injeção de oócitos no folículo dominante, para que ocorresse a maturação intrafolicular do oócito e a fecundação após a ovulação.

Para a injeção dos oócitos, o mandril da guia de aspiração folicular (WTA®) foi adaptado com uma agulha de cateter nº 22 G (Descarpack®), e no circuito de aspiração (WTA®) tinha uma seringa de 1 mL (tipo de insulina) acoplada para aspirar os oócitos (Figura 3). O circuito foi preenchido com PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato - (DMPBS® - Dulbecco - Biodux) + 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®), mais 0,1 mL de ar e os oócitos de cada gota por vez, foram aspirados junto com 0,1 mL de PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato - (DMPBS® - Dulbecco - Biodux) + 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®), e ficavam alojados próximos da ponta da agulha para facilitar a injeção total destes.

Feito isso, o mandril (WTA®) contendo os oócitos, foi levado até o brete de contenção onde estava cada vaca ovuladora.

A vaca por sua vez, contida no brete foi higienizada e anestesiada com injeção epidural baixa, contendo 60 mg de cloridrato de lidocaína (Lidovet®, Bravet). Posteriormente, fazia-se a higienização com solução de 10 L de água acrescida de 10 mL de solução desinfetante (CB30 TA®, Ouro Fino) e secagem ao redor do ânus e vulva com papel toalha. Então a guia de aspiração (WTA®) acoplada a um ultrassom (Mindray® DP 2200) foi introduzida via vagina utilizando camisa sanitária (WTA®) para proceder à injeção dos oócitos no folículo dominante de cada vaca. Colocava-se o mandril (WTA®) com os oócitos na guia (WTA®), e o ovário era manipulado via transretal de modo a posicionar o folículo dominante para a entrada da agulha da guia (WTA®). Feito isso, por meio da seringa acoplada no circuito dentro mandril da guia de aspiração (WTA®), os oócitos foram injetados no folículo dominante.

Logo após, a vaca foi inseminada com uma dose de sêmen convencional (sêmen congelado/descongelado, comercial), e aplicação de 25 ug de Acetato de lecirelina (Tecrelin®, Tecnopec / Agener União) no D9 do protocolo. Cada vaca foi avaliada a cada 12 e 24 horas para verificar a ocorrência da ovulação, e em caso negativo, foi realizada uma segunda inseminação e avaliação ultrassonográfica.



Figura 3: Montagem do circuito de injeção dos oócitos na guia de aspiração na TIFOI

3.6. Coleta dos embriões

Posteriormente à avaliação ultrassonográfica no D17, foi então, realizado o lavado uterino para a coleta de embriões, oito dias após a primeira inseminação artificial. Para isso utilizava-se por vaca, uma sonda de Folley nº 22 (Solidor® 2 vias) acoplado ao sistema fechado em Y, sendo que em uma extremidade foi acoplado um frasco de 1000 mL de solução Ringer com lactato (Fresenius®) acrescido de 0,4 % de BSA (Albumina Sérica Bovina-BioXtra®), e na outra extremidade o filtro coletor para embriões com malha de 80 µc (WTA®). Posteriormente foram feitos três lavados uterinos no corpo do útero por vaca com 150 a 250 mL por vez (essa quantidade em função do tamanho do útero para se obter pressão negativa e efeito sifonante da solução introduzida). Após o lavado, o conteúdo do filtro coletor para embriões com malha de 80 µc (WTA®) foi vertido em uma placa de Petri estéril 90x15 mm (Firstlab®) e fazia-se o rastreamento dos embriões utilizando estereomicroscópio (Olympus®) em aumento de 40 X. Em todas as vacas após o lavado uterino, foram aplicadas 0,5 mg de Cloprostenol sódico (Estron®).

Os embriões coletados foram avaliados e classificados conforme sua morfologia de acordo com a IETS (International Embryo Transfer Society, 2013).

Posteriormente os embriões foram envasados em palhetas finas de 0,25 mL (IMV®), preenchendo uma coluna com solução de meio Holding (Holding Plus®), bolha de ar, coluna com solução de meio Holding (Holding Plus®) com o embrião, outra bolha de ar, e outra coluna com solução de meio Holding (Holding Plus®), e o lacre de identificação (Figura 4).

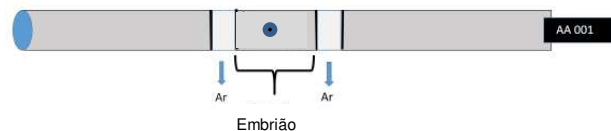


Figura 4: Envase dos embriões obtidos pela técnica de TIFOI em bovinos

Após o envase as palhetas (IMV®) foram imediatamente submersas em Nitrogênio Líquido (-196°C) e estocadas para estudos de expressão gênica a posteriori.

3.7. Esquema representativo da técnica da TIFOI

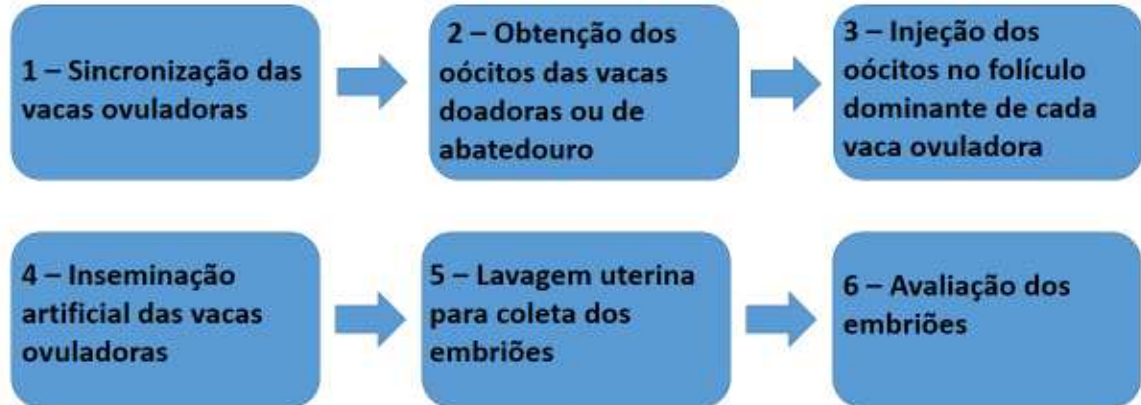


Figura 5: Etapas na execução da técnica da TIFOI em bovinos

3.8. Análise estatística

Os dados obtidos (resposta a sincronização do estro e ovulação, intervalo da retirada do dispositivo `ovulação, presença do corpo lúteo no dia 17 após início do protocolo, diâmetro folicular no dia 7 do protocolo e no dia 9 (injeção dos oócitos intrafolicular) e taxa de crescimento folicular do dia 7 ao dia 9, total de oócitos injetados no folículo dominante e número de estruturas recuperadas no dia 17 do protocolo) foram avaliados por meio de estatística descritiva: média e percentual para os parâmetros estudados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início da pesquisa realizou-se um levantamento bibliográfico sendo constatado que a técnica de transferência intrafolicular de oócitos imaturos é uma técnica nova, surgiu como uma terceira opção para produção de embriões após a superovulação de doadoras (SOV) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), mas ainda necessita de aprimoramento como ocorreu com as demais biotécnicas reprodutivas. Corroborando com trabalhos anteriores, no presente estudo se constatou a permanência de limitações nesta técnica que não foram bem esclarecidos e por isso

ainda se obtém baixas taxas de recuperação embrionária, que inviabiliza o seu uso comercial (Tabela 1), apesar de já terem conseguido com sucesso, embora baixos, a produção de embriões de boa qualidade por meio desta técnica e nascimento de bezerras saudáveis (KASSENS et al, 2015; SPRICIGO et al, 2017).

No presente estudo, a execução das etapas da técnica de TIFOI, elas se mostraram perfeitamente exequível quando empregada por um técnico que tem uma prática em manuseio em processo de aspiração folicular. Em quatro seções na qual foi feita aspiração folicular nas doadoras de oócitos obteve-se sucesso na recuperação de oócitos sendo suficiente para que se procedessem a injeção intrafolicular (Tabela 1). Em média 17,5 oócitos foram injetados nos folículos dominantes. Esses valores se mostram bem abaixo dos valores médios de oócitos injetados por folículo dominante nos estudos consultados, onde os autores injetaram em média, 25 oócitos por folículo dominante (SPRICIGO et al, 2016; DIAS, 2021). No presente estudo, esse baixo valor foi empregado em função do total de estruturas recuperadas por meio da aspiração folicular nas vacas doadoras de oócitos, sendo apenas 3 vacas utilizadas no presente estudo. Contudo quando foi empregado a aspiração folicular em ovários oriundos de frigorífico nas duas últimas seções da TIFOI, empregou-se valores acima de 17 (18, 38, 35, 40; Tabela 1) por folículo dominante.

No D17, dia do lavado uterino, as taxas de recuperação de embriões foram muito baixas (2,6 %) sendo considerado valores extremamente baixos e insatisfatórios. Na literatura consultada as taxas de recuperação se mostraram muito baixas variando entre 10 a 27 % (HOELKER et al, 2017; SPRICIGO; DODE, 2017). As baixas taxas de recuperação de estruturas, principalmente embriões ainda demonstram que a biotécnica TIFOI ainda poderá se tornar uma alternativa às biotécnicas de superovulações e transferências de embriões convencionais ou à produção de embriões *in vitro*, desde que aprimorada e que resultados melhores na produção de embrião sejam alcançadas.

Diversos são os fatores que podem estar contribuindo com os baixos valores de recuperação embrionária, entre eles o tempo de maturação oocitária intrafolicular, o extravasamento do fluido folicular juntamente com os oócitos injetados caindo na cavidade abdominal, em função do calibre da agulha (22 G) usada para a injeção dos oócitos, a assincronia no crescimento embrionário em função dos diferentes estágios de maturação oocitária e ou desenvolvimento embrionário, a taxa de ovulação após a

injeção intrafolicular dos oócitos, e falhas na captação dos oócitos ovulados pelo infundíbulo (PRESTES; ALVARENGA, 2006).

No presente estudo entre as possibilidades anteriormente citadas provavelmente tenha ocorrido perdas por falhas na captação dos oócitos pelo infundíbulo ou extravasamento do fluido folicular juntamente com os oócitos injetados em função do diâmetro da agulha empregada (22 G). Visto que em 4 ocasiões foi possível a obtenção de embriões (2,6 %).

Outro aspecto importante que deve ser ressaltado é o volume de 0,2 mL de PBS empregados para injetar os oócitos. Este volume se mostra elevado quando comparado a 0,06 mL empregados na maioria dos trabalhos consultados (DIAS, 2021; SPRICIGO et al., 2016). Embora haja possibilidade de ter ocorrido extravasamento no presente estudo constatou-se o processo de ovulação com a presença do corpo lúteo no D17 em 72,2 % do total de protocolos de sincronização realizados (Tabela 2), além disso, constatou-se apenas a ruptura folicular em um animal do presente estudo, no momento em que se realizava a injeção intrafolicular dos oócitos.

Entre as estruturas recuperadas obteve-se 7 embriões, sendo dois (2) blastocistos de grau 1, dois (2) blastocistos degenerados, uma (1) mórula degenerada, um (1) embrião de 2 células e um (1) embrião de 4 células, e nenhum oócito. Esses resultados apesar de se mostrarem muito baixos, com somente 2 embriões transferíveis, indicam que essa biotécnica necessita de outros estudos no intuito de elucidar quais as limitações que realmente afetam a taxa de clivagem embrionária e produção de blastocisto em valores aceitáveis para que se torne uma biotécnica comercial. Esses baixos valores corroboram com todos os trabalhos consultados, onde demonstram baixa produção de embriões viáveis (PRESTES; ALVARENGA, 2006; SPRICIGO et al., 2016).

Com relação as estruturas recuperadas, constatou-se a assincronia entre o desenvolvimento embrionário, sendo blastocistos, embriões de 2 células ou 4 células. Provavelmente essa assincronia se deve ao fato de diferentes fases de maturação oocitária na ocasião da aspiração folicular e posterior tempo de maturação intrafolicular nas fêmeas ovuladoras e conseqüentemente resultando em embriões de diferentes fases de desenvolvimento. Tais observações corroboram com estudos anteriores que obtiveram embriões em diferentes fases de desenvolvimento tais como blastocistos eclodidos, blastocistos, mórulas, 16 células, 4 células e embriões degenerados (KASSENS et al., 2015; HOELKER et al., 2017).

Além da assincronia na maturação oócitaria e desenvolvimento embrionária devido aos diferentes estágios de desenvolvimento folicular, deve se ressaltar ao fato das doadoras de oócitos não tiveram suas ondas foliculares sincronizadas, estando no dia da aspiração folicular ou coleta de ovários no abatedouro, em diferentes fases do ciclo estral, com presença ou não de corpo lúteo no ovário. Portanto, possivelmente muitos folículos, poderia nesta ocasião se encontrarem já em fase de atresia folicular e obtido o restabelecimento do seu crescimento quando injetado no folículo dominante da ovuladora. Porém, este restabelecimento não tenha ocorrido de forma sincrônica e com diferente potencial de desenvolvimento, passagens nas diferentes etapas da meiose e maturação nuclear dos mesmos. Os folículos que na ocasião das aspirações foliculares já se encontravam em atresia folicular acima de 48 horas e aqueles folículos em atresia avançada da onda de crescimento folicular anterior, não possuem capacidade de retornar ao crescimento e avança no processo de apoptose, o que provavelmente impactou o número e estruturas embrionárias obtidas no dia 17, ocasião do lavado uterino das ovuladoras.

Conforme os estudos preconizados por BO et al. (2002) e BO et al. (2007) as taxas de concepção apresentadas em protocolos de sincronização de estro que utilizam estradiol, GnRH, PGF2 α , com uso de dispositivo de liberação lenta de progesterona têm sido ente 40 e 50 %, podendo variar de 27,8 a 75 %. Também pode ser utilizado o eCG (gonadotrofina coriônica equina) que tem ação de FSH e LH e seu uso é indicado para rebanhos com baixa ciclicidade, e vacas magras (BARUSELLI et al., 2004c).

A utilização de protocolos diferentes do que foi utilizado no Brasil pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia podem ser aplicados, porém requer novas avaliações, com o acompanhamento do momento da ovulação (SPRICIGO e DODE 2017). No presente estudo diferente da maioria dos protocolos empregados dos trabalhos consultados adotou-se a aplicação de 2 doses de Cloprostenol sódico sendo a primeira dose, 48 horas antes da retirada do dispositivo intravaginal e a segunda no dia da retirada. Este protocolo foi adotado como predileção aos estudos prévios realizados pela equipe (dados não publicados). Além disso, como não havia histórico reprodutivo dos animais utilizados no presente estudo, e sendo também um número limitado de animais, optou-se por utilizar este protocolo com duas doses de Cloprostenol sódico na intenção de auxiliar o bom crescimento do folículo pré-ovulatório e a ovulação (concentrações basais de progesterona, aumento de

estrógeno), e posterior formação de um corpo lúteo competente e melhora na taxa de recuperação embrionária obtida por meio desta técnica.

Tabela 1: Diâmetro folicular, número de oócitos injetados (Aspiração Folicular *in vivo* e Aspiração Folicular em ovários de origem abatedouro) no folículo dominante no D9 e número de estruturas recuperadas no lavado uterino no D17, em fêmeas ovuladoras submetidas ao programa da TIFOI

Diâmetro folicular D9 (mm)	Nº oócitos injetados D9	Nº estruturas recuperadas D17
<i>Aspiração Folicular in vivo</i>		
10,0	15	0 (00,0)
09,0	15	4 (26,7)
11,0	12	1 (08,3)
11,1	8	0 (00,0)
<i>Aspiração Folicular em ovários de origem abatedouro</i>		
10,5	18	1 (05,5)
09,2	38	1 (02,6)
13,5	35	0 (00,0)
10,9	37	0 (00,0)
09,4	4	0 (00,0)

Com relação ao protocolo de sincronização de estro e ovulação, no presente estudo obteve-se 100 % de sincronização de estro, identificado pelo comportamento de estro do animal, contratilidade uterina, presença de muco e folículo dominante na avaliação ultrassonográfica e 72,2 % de ovulação (tabela 2). Estes valores se mostram pouco abaixo aos valores médios obtidos para taxa de ovulação, em média 80 - 85% (VASCONCELOS et al., 1999; SÁ FILHO et al., 2010b; PFEIFER et al., 2016), porém, ainda considerado como valores satisfatórios (SALES et al., 2019).

Com relação ao intervalo da retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação, o valor médio no presente estudo foi de 66,75 horas e o intervalo da injeção intrafolicular dos oócitos à ovulação foi de 18,75 horas (tabela 2). Estes valores se mostram próximos aos valores obtidos nos estudos anteriores em protocolos de sincronização

de estro e ovulação empregados em programas de inseminação artificial em tempo fixo (MIZUTA et al., 2003; PFEIFER et al., 2016).

O tempo de 18,75 horas com o intervalo da injeção intrafolicular dos oócitos à ovulação demonstra um bom tempo para proporcionar um ambiente intrafolicular para que ocorra maturação oocitária. Nos estudos realizados com produção de embriões *in vitro* (PIVE) usualmente os autores preconizam intervalos de 16 a 22 horas, com média de 18 horas de incubação em meios de maturação (THOMPSON et al., 2000; DIAS et al., 2007). Corroborando, Dias (2021) verificaram que quando ocorre um tempo superior a 22 horas há degeneração dos oócitos, com redução da taxa de maturação, mesmo em ambiente intrafolicular *in vivo* (TIFOI) que foi empregado pelos autores.

Tabela 2: Resposta ao protocolo de indução de estro e ovulação em fêmeas bovinas, submetidas ao protocolo de TIFOI

Total de Protocolos	Resposta à ovulação (%)	Intervalo retirada dispositivo Intravaginal e ovulação (h)	Intervalo injeção de oócitos e ovulação (h)	Presença de Corpo Lúteo no dia 17 (%)
18	13 (72,00)	66,75	18,75	13 (72,20)

Com relação ao diâmetro folicular no presente estudo, constatou-se que a eficácia do protocolo de sincronização de estro, onde no momento da retirada do dispositivo intravaginal (D7), por análise ultrassonográfica, foi possível identificar uma nova onda folicular com a presença de um folículo maior. No total de 18 protocolos, o diâmetro médio do folículo maior no D7 foi de 8,75 mm e no D9, no dia da injeção intrafolicular, o folículo dominante apresentava folículo de 10,5 mm, com taxa de crescimento folicular diário de 0,86 mm (Tabela 3).

Os estudos realizados anteriormente preconizam a realização da TIFOI somente em fêmeas ovuladoras apresentando diâmetro do folículo dominante acima de 10 mm (KASSENS et al., 2015; SPRICIGO et al., 2016), porém no presente estudo, apenas 9 dos 18 folículos dominantes no dia da injeção intrafolicular possuíam valores

acima de 10 mm. Estas fêmeas foram utilizadas em função no número experimental reduzido de fêmeas ovuladoras (2 fêmeas). Entretanto, após os lavados uterinos realizados no D17, houve recuperação embrionária oriundo de 4 fêmeas apresentando folículos maiores (2 folículos) e menores (2 folículos) de 10 mm de diâmetro folicular.

Deste modo, no presente estudo, folículos com diâmetro folicular acima de 9 e menores de 10 mm não comprometeram o processo de maturação folicular e consequente ovulação. Apenas uma fêmea não ovulou, no D17 não havia a presença de um corpo lúteo avaliada pela ultrassonografia. Outros estudos já haviam constatado ovulações oriundas de folículos dominantes com diâmetro folicular inferiores a 10 mm observado no D9, dia da inseminação artificial em programas de IATF (JOLLY et al., 1994; BÓ et al., 2000).

Tabela 3: Diâmetro folicular e taxa de crescimento do dia 7 a 9 do protocolo de sincronização de estro e ovulação em fêmeas bovinas, submetidas ao programa de TIFOI

Total Protocolos	Diâmetro Folicular D7 (mm)	Diâmetro folicular D9 (mm)	Taxa de crescimento folicular/diário (mm)
18	8,75	10,51	0,86

No presente estudo a execução da técnica como um todo se mostrou facilmente exequível por um técnico treinado, sendo perfeitamente possível de realização em ambiente de fazenda sem a necessidade de recursos muito tecnológicos como estrutura de laboratório especializado, independente do espaço geográfico, tamanho de rebanho e propriedade, podendo ser ofertada a pequenos e grandes produtores.

Entretanto, os resultados obtidos nos presentes estudos no qual apresentou limitações principalmente relacionados ao número de estruturas recuperadas no D17. Tais resultados corroboram a todos os valores obtidos nos estudos anteriores no qual se empregou a biotécnica TIFOI. Muitos estudos são necessários de modo a entender e solucionar os fatores limitantes que possam estar comprometendo estes resultados

de modo que possamos torná-la uma biotécnica convencional como alternativa as já existentes como a SOV e PIVE.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, comprovou-se a funcionalidade de se executar a técnica de transferência intrafolicular de oócitos imaturos, e também a produção de embriões por meio da técnica, mas ainda se obteve baixa taxa de recuperação embrionária.

Há necessidade de novos estudos no intuito de identificar e corrigir os fatores limitantes desta biotécnica, que apesar da baixa produção de embriões, poderá se tornar uma alternativa exequível e de baixo custo para produção de embriões bovinos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

ADAMS, G.P. et al. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

AMBROSE, D. et al. Synchronization of ovulation and conception rates in Holstein heifers given an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR), and estradiol cypionate, porcine LH or gonadotropin releasing hormone. **Arch Tierzucht**, v.44, p.77-79, 2001.

ANDRLIKOVA, M. et al. Intrafollicular oocyte transfer in cattle—a technical report. **Acta Veterinaria Brno**, v. 89, n. 1, p. 11-17, 2020.

ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

BARBOSA, A. J. S. **Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI): revisão de literatura**. 33f. Graduação (Trabalho de conclusão de curso). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

BARUSELLI, P.S. et al. Ovarian superovulation in embryo recipients to improve the number of corpus luteum, progesterone concentration and pregnancy rates. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.28, p.218, 2000. Resumo.

BARUSELLI, P.S. et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 3, 2008, Londrina, PR. Anais... Londrina: SIRAA, p.146-167, 2008.

BARUSELLI, P. S. et al. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (suplemento), p. 228, 2004a.

BARUSELLI, P. S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 214, 2003.

BARUSELLI, P. S. et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. **In: International Congress on Animal Reproduction**, 15, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil. Abstracts... Porto Seguro - BA: ICAR, 2004b. v.1, p.17. Resumo.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004c.

BINELLI, M. et al. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. Supl 1, p. 1-7, 2006.

BLANCO, M. R. et al. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 6, n. 7, p. 155-165, 2011.

BO, G.A. et al. **Dinâmica folicular ovarica em el bovino. In MADUREIRA, E.H BARUSELLI, P.S controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, São Paulo, FUNVET, 2000, p.12-34.

BO, G. A. et al. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. **Taurus**, v. 15, n. 15, p. 17-32, 2002.

BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995.

BO, G. A. et al. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. **Society for the Study of Reproduction and Fertility**, v. 64, p. 223-236, 2007.

BO, G. A. et al. Effect of Estradiol Valerate on Ovarian Follicles, Emergence of Follicular Waves and Circulating Gonadotropins in Heifers. **Theriogenology**, v. 40, n.2, p. 225-239, 1993.

BO, G. A. et al. Follicular Wave Dynamics after Estradiol-17-Beta Treatment of Heifers with or without a Progestogen Implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555- 1569, 1994.

BÓ, G. A. et al. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

BORGES, Á. M. et al. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 85-92, 2003.

BORNSLAEGER, E. A. et al. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 114, n. 2, p. 453-462, 1986.

BREVINI-GANDOLFI, T.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n. 11, p. 1-7, 2008.

CALLEJAS, S. S. Fisiología del ciclo estral bovino. In: Palma GA. Biotecnología de la reproducción. Mar del Plata: **Reprobiotec**, 2001.p.37-49.

CARABATSOS, M. J. et al. Oocyte–granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental Biology**, v. 226, n. 2, p. 167-179, 2000.

CARLSON, J. C. et al. Prostaglandin F_{2α} and the release of LH in sheep. **Journal Reproduction Fertility**, v. 34, p. 357-361, 1973.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 9-14, 1998.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CRUZ, L. C. et al. Effect of prostaglandin F_{2α} - and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 2-3, p. 135-142, 1997.

CUNNINGAM, J. G. Ciclos Reprodutivos. In: AUTUMN, P.; GEORGE, H. Tratado de Fisiologia Veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1999. Cap. 36, p.368-376.

DALE, B.; DEFELICE, L. Polyspermy prevention: facts and artifacts? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 199-207, 2011.

DEMYDA-PEYRÁS, S. et al. Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 1077-1084, 2013.

DELEUZE, S. et al. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 203-209, 2009.

DEMÉTRIO, D. G. B. **Colheita e transferência de embriões bovinos**. São Paulo, SP.2003. p. 22-23. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. 2003.

DHALIWAL, G. S. et al. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 135-152, 2001.

DIAS, F. M. G. N. **Efeito da condição corporal, razão peso/altura e peso vivo sobre o desempenho reprodutivo pós-parto de vacas de corte zebuínas**. 1991. 98 f. (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

DIAS, L. R. O. **Fatores que afetam a produção de embriões pela transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos**. 2021. xvii, 84 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Animais) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

DIAS, P. B. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

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

FALCHI, L. et al. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT): Potential feasibility in the ovine species. **Theriogenology**, v. 179, p. 7-13, 2022.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais Comuns** (Causas e Tratamentos). Juiz de Fora: 1ª Edição, 2010. 422p.

FIGUEIREDO, M. M. N. et al. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras no pós-parto após tratamentos com buserelina (GnRH) e cloprostenol (PGF2alfa). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 725-731, 2000.

FILHO, M. K. et al. Produção in vitro de embriões bovinos em tubos sem controle da atmosfera gasosa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 209-216, 2003.

FORTUNE, J.E. et al. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, 82/83, p.109-126, 2004

FORTUNE, J. E. Follicular dynamics the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v.33, p.111-125, 1993.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n.6, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O. J. et al. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, p.475-482, 2002.

GINTHER, O. J. et al. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

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

GORDO, A. C. et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 59, n. 1, p. 106-114, 2001.

GROOTHUIS, P. G. et al. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 4, p. 405-417, 2007.

HANLON D. W. et al. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.47, p.963-75, 1997.

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.3, p.245-264, 2003.

HINRICHS K.; DIGIORGIO LM. Embryonic development after intrafollicular transfer of horse oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl. V. 44, p. 369-74, 1991.

HOELKER, M. et al. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 97, p.41–49, 2017.

HOMA, S. T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, n. 1, p. 122-134, 1995.

JOLLY, P.D. et al. Apoptose em células da granulosa bovina em relação à síntese de esteróides, resposta cíclica de adenosina 3', 5'-monofosfato ao hormônio folículo-estimulante e hormônio luteinizante e atresia folicular. **Biologia da Reprodução**, 51(5), 934–944. 1994.

KASSENS, A. et al. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir Derived and *In Vitro*-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 150, 2015.

KINDER, J. E. et al. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

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

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255-267, 1992.

LAUDERDALE, J. W. The use of prostaglandins in cattle. **In: Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, EDP Sciences, 1975. p. 419-425.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. **Journal of Animal Science**, v.48, p.76-86, 1979.

LEONARDI, C. E. P. et al. Prostaglandin F₂ α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1578-1582, 2012.

LOPEZ, J. P. S. **Ovarian and hormonal events during synchronization of ovulation and timed appointment breeding of Bos indicus- influenced cattle using intravaginal progesterone, GnRH and prostaglandin F₂ α** . 2005. 96 f. (Master of Science) - Texas A&M University.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, 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, n.6, p. 883-889, 1991.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 307-320, 1996.

MARTINEZ, M. F. et al. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 224, 2003.

MARTINEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

MASSONE, F. **Atlas de Anestesiologia Veterinária**. São Paulo: Roca, p. 69, 2003.

HOELKER, M. et al. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 97, p. 41-49, 2017.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** 2003. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Acesso em: 10 dez. 2022.

MURRAY, A. J. et al. Treatment with progesterone and 17 β -oestradiol to induce emergence of a newly-recruited dominant ovulatory follicle during oestrus synchronisation with long-term use of norgestomet in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1-2, p. 11-26, 1998.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic-Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

OLIVEIRA, G. M. Fisiologia da Reprodução Bovina e Métodos de Controle do Ciclo Estral. **Trabalho de conclusão do curso de especialização em Reprodução e Produção de Bovinos–UCB.** Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

PANSANI, M. A.; BELTRAN, M. P. Anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas. **Revista Electrónica de Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-5, 2009.

PEIXOTO, M. G. C. D. et al. Multivariate analysis of multiple ovulation followed by embryo transfer results from zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.54, n.5. 2002.

PENG, X. R. et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3200-3207, 1991.

PETERS, A. R. et al. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1317-1326, 2000.

PFEIFER, L. F. M. et al. The use of PGF₂ α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689-695, 2014.

PFEIFER, L. F. M. et al. Prostaglandin F₂ α or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 738-744, 2016.

PICARD-HAGEN, N. et al. Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177-183, 2015.

PICTON, H. et al. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.

PRESTES, N. C.; ALVARENGA, F.C.L. Fecundação e Clivagem. In: ALVARENGA, F.C.L. **Obstetrícia Veterinária**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. cap. 1, p. 1-19. 2006.

RANDEL, R. D. et al. Exogenous PGF₂ α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 643-654, 1996.

RATHBONE, M. J. et al. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

RIZOS, D. et al. Consequências das condições de cultivo in vitro no desenvolvimento e qualidade do embrião. **Reprodução em Animais Domésticos**, v. 43, p. 44-50, 2008.

ROMAGNOLI, S. et al. Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 36-39, 2009.

RUMPF, R. et al. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. **Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, v. 3, 2000.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 651-658, 2010a.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 182-187, 2010b.

SALES, J. N. S. et al. Pre-TAI protocol strategies to increase reproductive efficiency in beef and dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 16, p. 402-410, 2019.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896-1912, 2012.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SILVA, J. C. B.; **Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção in vitro de embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados.** 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUZA, A. H. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, p.10-21, 2009.

SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 6. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541. 2017.

SPRICIGO, J. F. et al. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054-62, 2016

SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N.; **Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2017.

SPRICIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. **Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI):** uma alternativa para produção de embriões bovinos. Brasília, DF: Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 353, 2016.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS**, p. 112-113, Illinois, 2013.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v.9, n. 3, p. 210-216, 2012.

STEUERWALD, N. et al. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. **Zygote**, v. 8, n. 3, p. 209-215, 2000.

STEWART F.; ALLEN W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionicgonadotrophins. **Journal Reproduction Fertility**, v.62, p.527-36, 1981.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

TRIPATHI, A. et al. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 3, p. 592-600, 2010.

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

VASCONCELOS, J.L.M. et al. Taxa de sincronização, tamanho do folículo ovulatório e taxa de prenhes após a sincronização do início da ovulação em diferentes dias do ciclo estral em vacas leiteiras em lactação. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, pág. 1067-1078, 1999.

VIANA, J.H.M. Estatísticas do mercado de embriões. **Jornal O Embrião**, v.67, p.26-31, 2021.

WARBERG, J. et al. Prostaglandin-induced release of anterior pituitary hormones: structure-activity relationships. **Endocrinology**, v. 98, p. 1135- 1141, 1976.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. suppl_13, p. E1-E3, 2007.

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

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction (AR)**, v. 13, n. 3, p. 279-282, 2018.

WERNER-VON DER BURG W. et al. Pregnancy following intrafollicular gamete transfer. **Human Reproduction**, v.8, p.771-774, 1993.

WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.