

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

ANITA SOARES BARBOSA GUIMARÃES

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DOADORAS
ZEBUÍNAS (*Bos indicus*) E TAURINAS (*Bos taurus*)**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO-2018**

ANITA SOARES BARBOSA GUIMARÃES

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DOADORAS
ZEBUÍNAS (*Bos indicus*) E TAURINAS (*Bos taurus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires
Barbosa

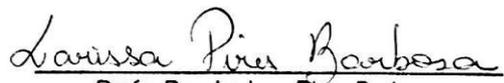
**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

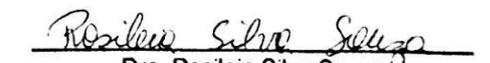
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANITA SOARES BARBOSA GUIMARÃES

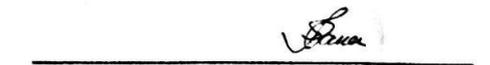
PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DE DOADORAS ZEBUÍNAS
(*Bos indicus*) E TAURINAS (*Bos taurus*)



Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Dra. Rosileia Silva Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. Dra. Fabiana Lana de Araújo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 16 de agosto de 2018.

*Dedico esta monografia às grandes mulheres da minha vida:
minha vó Maria, minha mãe Lucyene, minha irmã Lara, minhas
tias Joana, Lucyana e Ada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, a todos os Espíritos de Luz e meu Anjo Guardião, que me iluminaram, me deram forças e saúde durante toda caminhada.

À minha família, por sempre acreditar e investir em mim e por ser sempre meu porto seguro.

À minha amada Vó Lia, por toda sabedoria, tranquilidade, apoio e amor para sempre seguir em frente.

À minha amada Mãe, por toda sua dedicação, esforço e todo seu amor.

À minha irmã Lara, por sempre me incentivar, acreditar em mim e me escutar em dias desesperadores.

Às minhas tias Jô, Lu e Ada, que muitas vezes, foram minhas mães, quando a minha não pôde estar presente. Obrigada por sempre me receberam e me amaram como filha!

Às minhas primas lindas e amadas, que são como irmãs para mim, Maria Eduarda e Maria Luiza, por todo amor, carinho e confiança.

Aos meus primos Glauco e Pedro, que nunca me deixaram na mão e sempre estiveram dispostos a me ajudar no que eu precisasse.

Ao meu querido vô Zé, por toda sua alegria e incentivo.

Aos meus tios Mariano e Duda, por todo apoio.

Ao meu filhote de quatro patas, Tom, meu gatuco preto, por todo amor, amizade e companheirismo.

A “Meu bem”, Fernando, que esteve ao meu lado, me dando forças, carinho e aguentou meus dias de estresse.

A “Dai”, por todo carinho, apoio, torcida e por ter cuidado do meu filhote durante o período que estive fora.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por ser uma instituição capaz de gerar aprendizado e conhecimento.

A todos os técnicos e funcionários da Fazenda Experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

A todos técnicos e funcionários do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da UFRB, em especial à Roque, Geremias, Vilma, Marizete, Ricko, Sr. Valdomiro e Alan, que sempre me receberam com um sorriso acolhedor e sempre estiveram ao meu lado vibrando por cada conquista.

À Carmo Biscarde, por todo ensinamento e amizade dentro e fora da Universidade.

À minha orientadora, Profa. Larissa, pela paciência na orientação e incentivo.

À coordenadora do curso, profa. Letícia Rezende pelo exemplo de profissional, professora e mulher.

Ao vice-coordenador do curso Prof. Robson Bahia, pelo convívio, por todo apoio e disposição durante a reta final.

A todos os outros professores, que contribuíram para essa caminhada, em especial ao Prof. Wendell Perinotto e Profa. Ana Elisa, pela amizade e apoio.

A todos meus amigos presentes da UFRB, que sempre me apoiaram e me incentivaram. Estenderam-me a mão para levantar quando foi preciso, conselhos, carinho. Em especial, agradeço a Mari, Tali, Gian, Rosi, Lai, Roni, Fernando, Ju, Átila, Deise, Vini, Laís. Vocês foram minha família em Cruz das Almas, sem vocês tudo seria muito mais doloroso e difícil. Aos meus amigos distantes em km, mas sempre presentes e que sempre me apoiaram e acreditaram em mim: Gabi e Pedro.

A todo pessoal da Fazenda Casa Branca Agropastoril, pela oportunidade de realizar o presente estudo no local.

Ao meu “pai” da Reprodução, o Médico Veterinário Pedro Ribeiro, “Pedrão”, por ter acreditado em mim, por todos ensinamentos, por ter me apresentado a PIVE e por ter me despertado essa paixão. Tenho a certeza que além de “pai-filha” na Medicina Veterinária, também somos “pai-filha” na vida.

Ao Heitor, por ter acreditado em mim e no meu potencial.

À Jô e Gui, pela amizade, momentos de descontração, risadas e por todo apoio e carinho.

Aos Médicos Veterinários Pedro Paulo e José Augusto pelos ensinamentos durante o estágio.

Ao Sr. Reis, Eduardo (Vô), Marlene, pelo carinho com que sempre me receberam e me trataram.

A todo pessoal da baía e funcionários da fazenda.

Agradeço aos animais que passaram por mim durante todo processo de formação, me ensinando cada dia mais.

Por fim, serei eternamente grata de alguma forma por todos aqueles que contribuíram para realização deste sonho e que torceram por esta realização.

EPÍGRAFE

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

Simone de Beauvoir

RESUMO

Teve-se como objetivo avaliar o efeito raça sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de doadoras de origem zebuína e taurina. Os complexos *cumulus* oócitos (COC's) foram obtidos de 167 doadoras *Bos taurus* e 161 *Bos indicus*, por meio de *Ovum pick-up*, em meio tampão fosfato salino à 36°C acrescido de heparina, e classificados em Grau I, II, III e desnudos quanto à qualidade morfológica, envasados em palhetas com meio de maturação e encaminhados ao laboratório. Foram maturados em incubadora entre 22 e 24h em meio de maturação e encaminhados à fertilização entre 18 e 22h. Os zigotos foram transferidos para meio de cultivo, permanecendo durante sete dias. Concluído o cultivo *in vitro*, os embriões foram classificados em mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX) e envasados em palhetas contendo meio de cultivo, encaminhados em transportadora com atmosfera 5% de CO₂, 5% de O₂ a 36°C, para transferência em receptoras devidamente sincronizadas. Após 30 e 45 dias da inovulação, realizou-se o diagnóstico de gestação. Os dados foram avaliados pelo teste Shapiro-Wilk, não atendendo critérios de normalidade, foram submetidos ao teste Mann-Whitney, considerando nível de significância menor que 0,05. Os animais *Bos indicus* apresentaram maior produção oocitária (n=2556), com 15,9 oócitos/doadora em comparação aos *Bos taurus* (n=1903), com 11,4 oócitos/doadora (P=0,008). Houve diferença para qualidade morfológica dos COC's (689 e 444 em GI, P<0,0001; 681 e 509 em GIII, P=0,010), com superioridade da raça zebuína. Não houve diferença entre os grupamentos para grau II (1101 zebuínas e 889 taurinas, P=0,110) e desnudos (85 zebuínas e 61 taurinas, P=0,311). Quanto à produção de embriões, houve diferença nas porcentagens obtidas de MO (0,44% zebuínas e 6,42% taurinas, P=0,017), BL (14,18% zebuínas e 3,74% taurinas, P<0,0001) e BX (81,43% zebuínas e 75,13% taurinas, P<0,0001). Não foi observado diferença para BI (3,96% zebuínas e 14,71% taurinas) (P=0,149). Não houve diferença em relação a taxa de prenhez (50,4% zebuínas e 44,5% taurinas) (P>0,05). Os animais *Bos indicus* apresentaram maior recuperação oocitária e maior número de oócitos viáveis em comparação às vacas *Bos taurus*, como também, maior produção de embriões viáveis.

Palavras-chave: Biotécnicas da reprodução; Doadoras; OPU; Cultivo *in vitro*

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of race on the in vitro production of bovine embryos from zebu and taurine donors. The cumulus-oocyte complex were obtained from 167 *Bos taurus* donors and 161 *Bos indicus*, was performed using phosphate-buffered saline at 36 °C added heparina and then oocytes were classified as grade I, II, III (GI, GII, GIII) or naked (D) according to morphological quality, packed in straws with maturation medium and sent to the laboratory on a carrier. They were cultured in a maturation medium for 22-24h. Following maturation, oocytes were submitted to fertilization between 18 and 22 h. The zygotes were transferred to a culture médium where remained for seven days. After the in vitro culture, the embryos were classified into morula (MO), initial blastocyst (BI), blastocyst (BL) and expanded blastocyst (BX) and packed in reeds containing culture medium, transported in a 5% CO₂ atmosphere, 5% O₂ at 36°C, for transfer in receivers properly synchronized. After 30 and 45 days of the innovation, the diagnosis of gestation was performed. The data were evaluated by the Shapiro-Wilk test, not attending normality criteria. The Mann-Whitney test was used to compare the means, considering a level of significance lower than 0.05. *Bos indicus* presented a greater oocyte recovery (n=2556), 15,9 oocytes/donors compared the *Bos taurus* (n=1903), 11,4 oocytes/donors (P=0,008). There was a difference in the morphological quality of COCs (689 and 444 in GI, P<0,0001; 681 and 509 in GIII, P=0,010), with zebu cattle superiority. There was no difference between breeds only for GII oocytes (1101 zebu cattle and 889 taurine cattle, P=0,110) and D oocytes (85 zebus cattle and 61 taurine cattle, P=0,311). Regarding the embryo production, was a difference in the percentages obtained from MO (0,44% zebu cattle and 6,42% taurine cattle, P=0,017), BL (14,18% zebu cattle and 3,74% taurine cattle, P<0,0001) and BX (81,43% zebu cattle and 75,13% taurine cattle, P<0,0001). There was no difference between breeds only for BI (3,96% zebu cattle and 14,71 taurine cattle, P=0,149). There was no difference between pregnancy rate (50,4% zebu cattle and 44,5 taurine cattle) (P>0,05). *Bos indicus* cows had a greater number of recovery oocytes and a higher number of viable oocytes compared to *Bos taurus* cows, as well as a higher production of viable embryos.

Keywords: Biotechniques of reproduction; Donors; OPU; In vitro Culture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Produção de Embriões <i>In vivo</i> x <i>In vitro</i>	21
Figura 2 – Laboratório da Fazenda Casa Branca Agropastoril.....	23
Figura 3 – Mapa ilustrativo referente a localização do município de Silvianópolis-MG	23
Figura 4 – Vacas Zebuínas da Raça Brahman.....	24
Figura 5 – Vacas Taurinas da Raça Angus	24
Figura 6 – Vacas Taurinas da Raça Simental	24
Figura 7 – Ultrassom e sistema de bomba a vácuo.....	25
Figura 8 – Manipulação e posicionamento do transdutor na OPU na Fazenda Casa Branca Agropastoril.....	26
Figura 9 – Ilustração da manipulação e posicionamento do transdutor na OPU	26
Figura 10 – Esquema do protocolo de sincronização utilizado nas receptoras de embriões PIV na Fazenda Casa Branca Agropastoril	28
Figura 11 – Taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos PIV	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Qualidade morfológica dos Complexo <i>Cummulus</i> Oócito a partir de doadoras taurinas e zebuínas	30
Tabela 2 – Qualidade dos embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de doadoras taurinas e zebuínas.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BL	Blastocisto
BX	Blastocisto Expandido
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
COC's	Complexo <i>Cumulus</i> Oócito
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
IA	Inseminação Artificial
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo-I
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MO	Mórula
OPU	<i>Ovum Pick-Up</i>
P4	Progesterona
PGF ₂ α	Prostaglandina- ₂ α
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
TE	Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Particularidades da fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas e taurinas	17
3.1.1. Desenvolvimento folicular	17
3.2. A produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos no Brasil	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Na busca pelo aperfeiçoamento e aumento da produtividade pecuária, o desenvolvimento e a utilização de biotécnicas da reprodução animal são consideradas ferramentas indispensáveis, principalmente em relação aos rebanhos bovinos, seja de corte ou de leite, já que estes apresentam longo intervalo de gerações e baixo número de descendentes. Biotécnicas como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), vêm sendo utilizadas com sucesso nessa espécie.

A possibilidade de multiplicação do material genético obtido a partir de fêmeas bovinas, (em quantidades superiores a TE), a PIVE tem sido largamente utilizada no Brasil e vem contribuindo de maneira decisiva na melhoria da qualidade e quantidade do produto final (MOCÉ et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008; SILVA et al., 2015).

Com a PIVE, objetiva-se principalmente, produzir um maior número de descendentes por fêmea doadora, assim como, aumentar a vida útil destas. Por meio dessa técnica é possível obter até um bezerro por semana, por doadora. Além disso, a PIVE permite que fêmeas com problemas reprodutivos adquiridos não sejam submetidas ao descarte precoce e, vacas geneticamente superiores tenham o seu potencial genético aproveitado ao máximo (GONÇALVES et al., 2008).

Quando comparada à TE, a PIVE apresenta algumas vantagens, como a dispensa de protocolos de superovulação, a utilização de diferentes touros para doadoras individuais e a viabilidade na utilização de sêmen sexado em escala comercial (BOUSQUET et al., 1999; GONÇALVES et al., 2008; RATH e JOHNSON, 2008; VARAGO et al., 2008; MELLO et al., 2016). Por outro lado, esta biotécnica segue apresentando algumas limitações devido à diversidade de fatores que influenciam nos resultados finais. Destacando-se os fatores relacionados à doadora, como: raça, genótipo, peso, idade, categoria animal, condição fisiológica, nutrição e estágio do ciclo estral; ao clima, como, temperatura, umidade relativa do ar; aos procedimentos da PIVE, como: os meios utilizados na maturação, fertilização e cultivo *in vitro*; e às receptoras (PEIXOTO et al., 2006; ANDRADE et al., 2012; MELLO et al., 2016).

Segundo dados da IETS (2014), 40,6% da produção mundial de embriões, são de embriões *in vitro*. Viana et al. (2010) afirmam que no Brasil há maior

produção de embriões *in vitro* (85,5%), do que embriões produzidos *in vivo* (14,2%). Isso porque, em 2004, a PIVE passou a ser a técnica de eleição para produção de embriões zebuínos. Em 2008, houve uma produção de 330.953 embriões *in vitro* no mundo, sendo que, destes, 220.425 foram produzidos no Brasil, totalizando 66,6% dos embriões, consolidando o país como referência no emprego das biotecnologias reprodutivas. Contudo, Viana et al. (2010) ressaltam que ainda existe uma grande variação nos resultados referentes à recuperação de oócitos e número de embriões, como mencionado anteriormente, diversos fatores podem influenciar no produto final.

No presente estudo, objetiva-se avaliar o efeito de raça, um dos fatores apontados como influenciador do resultado final, sobre a PIVE em bovinos a partir de doadoras de origem zebuína (*Bos indicus*) e taurina (*Bos taurus*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito raça sobre os resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de doadoras de origem taurina e zebuína.

2.2. Objetivo específico

Avaliar e comparar a qualidade morfológica dos complexos *cummulus* oócito (COC'S), a taxa de recuperação oocitária, a produção de embriões *in vitro* com base nos estádios de desenvolvimento e a taxa de prenhez.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Particularidades da fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas e taurinas

O conhecimento das particularidades da fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas e taurinas é essencial para a adequada implementação de biotécnicas, que buscam a melhoria da eficiência reprodutiva e a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores (BARUSELLI et al., 2007).

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas foram destinadas ao entendimento e estudo da população folicular ovariana pré antral e antral e o seu impacto sobre a reprodução dos bovinos e, conseqüentemente, sobre a eficiência das biotécnicas reprodutivas (SANTOS et al., 2016). Mesmo com progressos frequentes, diversas questões relacionadas à fisiologia reprodutiva da fêmea, continuam desconhecidas, principalmente considerando-se as diferenças entre zebuínos e taurinos (MOROTTI et al., 2015).

As diferenças na fisiologia reprodutiva de *Bos indicus* e *Bos taurus* no padrão de desenvolvimento da onda folicular, do recrutamento folicular, refletem na produção de oócitos e conseqüentemente na PIVE (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000 e 2010; BARUSELLI et al., 2007).

3.1.1. Desenvolvimento folicular

O folículo é unidade morfofuncional do ovário e é constituído por um oócito circundado por células da granulosa e tecais. Os folículos podem ser divididos de acordo com o grau de evolução em: folículos pré-antrais e folículos antrais (FIGUEIREDO et al., 2007).

O ovário dos mamíferos contém milhares de oócitos. Apesar da grande quantidade de oócitos, apenas uma pequena porcentagem (0,1%) será ovulada e, conseqüentemente, poderá ter possibilidade de ser fecundado, caracterizando assim uma baixa eficiência ovariana. A maioria dos folículos (99,9%) não atinge a ovulação e seguirá para o processo de atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2007).

As vacas são poliéstricas anuais e seu ciclo estral pode ser dividido em fase luteínica e folicular. Contudo, didaticamente, adota-se a divisão em quatro fases:

proestro, esto, metaestro e diestro, com duração total média de 20-21 dias (GONÇALVES et al., 2007).

Segundo Savio (1991), na fase folicular (ou fase de domínio estrogênico) incluem-se o estro e a ovulação e caracteriza-se por um maior crescimento folicular. O início dessa fase acontece após a queda nos níveis séricos de progesterona e consequentemente a ação da prostaglandina (PGF₂α), induzindo, assim, a luteólise (DIELEMAN et al., 1986). Já na fase luteínica (ou fase de domínio progestágeno), Savio (1991) indica que ocorre o máximo crescimento do corpo lúteo (CL) e sua consequente manutenção com a produção de progesterona (P4).

Nos bovinos, o desenvolvimento folicular ocorre em padrão de ondas (geralmente de duas a três ondas). A cada onda do crescimento folicular, um grupo de pequenos folículos são recrutados e iniciam uma fase de crescimento comum, esta etapa é conhecida como emergência folicular (GINTHER et al., 2003). Porém, apenas um destes folículos vai dar seguimento ao seu desenvolvimento, enquanto que os outros folículos vão sofrer regressão, fenômeno conhecido como divergência folicular (LUCY et al., 1992). Ginther et al. (1996; 2001) definem “divergência folicular” como o momento em que ocorre uma desproporção nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo que o maior folículo vai seguir o seu desenvolvimento e os demais irão sofrer declínio ou parada no crescimento.

Após a fase de divergência, e devido os altos níveis de progesterona e consequente redução na pulsatilidade de LH, o folículo dominante torna-se anovulatório. Inicia-se, então, o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989). O folículo dominante, presente no momento da regressão luteínica, culmina na ovulação (FORTUNE et al., 2004).

No dia zero do ciclo estral, se inicia a primeira divergência folicular, com diâmetro folicular médio de 4-5mm. Aproximadamente no dia seis do ciclo, esse folículo cessa o crescimento e sua regressão ocorre, geralmente, em torno do dia 13. Normalmente, no mesmo ciclo, no dia 10, se inicia o segundo crescimento folicular, que irá resultar em ovulação somente no estro seguinte (GONÇALVES et al., 2007).

Particularidades e diferenças são observadas na dinâmica folicular de *Bos taurus* e *Bos indicus*. O número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral é uma delas. A predominância de duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo

estral foi relatada em estudos realizados com animais da raça Holandesa (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004). Já em relação aos estudos realizados em zebuínos das raças Brahman (RHODES et al., 1995), Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997) e Gir (VIANA et al., 2000) são relatados a incidência de três ondas, e, até mesmo a ocorrência de quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral.

Outra diferença na fisiologia reprodutiva relatada em estudos entre *Bos indicus* e *Bos taurus* é o distinto número de folículos que são recrutados por onda de crescimento folicular, revelando que as fêmeas zebuínas recrutam maior número de folículos que as fêmeas taurinas (CARVALHO et al., 2007).

Os diferentes números de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, presentes nos ovários, parecem ter relação com o sistema do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF). Um estudo com vacas Brahman sugere que estes animais apresentam maiores concentrações plasmáticas de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000) e menores concentrações de FSH, quando comparadas com vacas da raça Angus (ALVAREZ et al., 2000).

Outros autores também levantaram a possibilidade de que o maior número de folículos presentes no ovário de zebuínos poderia ser em decorrência da elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (ALVAREZ et al., 2000; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BÓ et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009). Estudos também informam que o IGF-I está presente nos complexos *cummulus* oócito (COC's) (NUTTINCK et al., 2004) e em embriões no estágio de pré-implantação (LONERGAN et al., 2000).

Os dados encontrados na literatura sugerem que a divergência folicular em *Bos indicus* acontece em diâmetros inferiores aos relatados para *Bos taurus* e que, *Bos indicus* não apresenta uma grande variação entre diâmetros dos folículos dominante e subordinado. Nos estudos de Ginther et al. (1996), com bovinos *Bos taurus* (raça Holandesa), esta divergência folicular se inicia em torno do dia 2,8 (posteriormente a emergência) após o folículo dominante atingir em média 8,5mm e o folículo subordinado 7,2mm. Nos estudos de Gimenes et al. (2005), Sartorelli et al. (2005) e Castilho et al. (2006), realizados com novilhas *Bos indicus* (Raça Nelore), a divergência folicular teria início em torno do dia 2,5 (60 horas) a 2,7 (64 horas e 44

minutos) após o dia da ovulação, em que o folículo dominante atingiu o diâmetro de 5,4 a 6,2mm e o folículo subordinado 5,3 a 5,9mm de diâmetro. .

Em relação à importância do entendimento do desenvolvimento folicular para a PIVE, Boni et al. (1997) citam que o sucesso dessa técnica e da *Ovum Pick Up* (OPU), depende da população de folículos na fase antral. Dode (2006), por sua vez, sinaliza que a disponibilidade de uma população uniforme e competente de oócitos imaturos para serem maturados *in vitro* também é de grande importância para o sucesso da PIVE.

3.2. A produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil

O primeiro relato de possibilidade do cultivo de embriões de mamíferos *in vitro* ocorreu em 1920. Porém, somente na década de 1950, foi relatado o primeiro nascimento de um animal (coelho) a partir da PIVE. No final da década de 1970, surgiram as primeiras informações sobre a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos bovinos (GONÇALVES et al., 2008). O primeiro nascimento de um bezerro obtido através da PIVE foi relatado por Brackett et al., em 1982 (GALLI e LAZZARI, 1996). Após verificação de que a PIVE em bovinos poderia ser viabilizada, no final dos anos 1980, esta biotecnologia recebeu grande impulso. A partir da década de 1990, a PIVE passou a ser bastante difundida e utilizada em diferentes países e, de forma destacada, no Brasil (GONÇALVES et al., 2008).

Inicialmente, a PIVE foi utilizada para pesquisa, buscando estudar a fisiologia dos gametas masculino e feminino. Atualmente é utilizada em distintos segmentos da reprodução, tanto humana, quanto animal. Devido a essa pesquisa inicial, hoje é possível um conhecimento aperfeiçoado em relação ao crescimento, maturação e fecundação de oócitos, bem como o melhor entendimento a respeito da capacitação espermática e do desenvolvimento embrionário e alguns de seus mecanismos de regulação. A PIVE tem apoiado o desenvolvimento de outras biotécnicas como a clonagem por transferência nuclear, transgenia, sexagem de espermatozoides e embriões, preservação de oócitos e manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (GONÇALVES et al., 2008).

O primeiro bezerro produzido *in vitro* no Brasil, nasceu em 1994 (PEIXER et al., 1994). Mas só em 1998 esta técnica passou a ser utilizada de maneira comercial, com o projeto de inovação tecnológica financiado pela Fundação de Apoio a

Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões (GALLI, 2003).

Segundo o Departamento de Saúde Animal (DSA) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), o Brasil encontra-se em 20º lugar no ranking global de exportação de material genético bovino, e, devido ao alto padrão zootécnico que o rebanho bovino brasileiro vem adquirindo, o país apresenta grande potencial de crescimento visando atender à crescente necessidade de atender a demanda global por genética bovina.

Dados obtidos a partir da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) informam que a produção de embriões PIV, em um período de 15 anos, cresceu mais de 300%. Em 2002 foram produzidos 160.695 embriões PIV e em 2016, 666.215. Neste mesmo ano de 2016, o volume de embriões produzidos *in vitro*, ultrapassou o volume de embriões produzidos *in vivo* (Figura 1).

Figura 1 – Produção de Embriões *In vivo* x *in vitro*

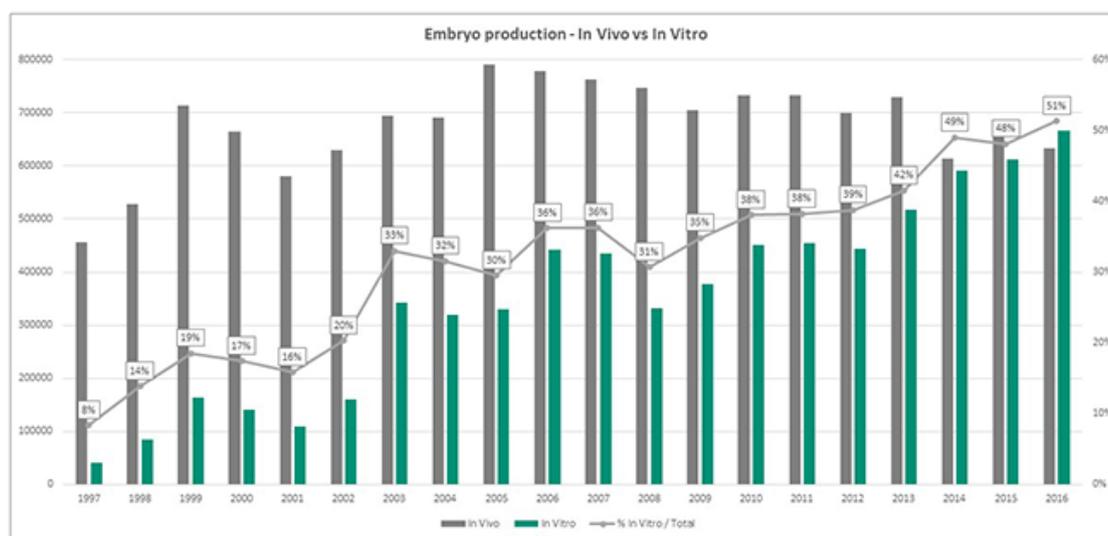


Gráfico publicado por Blondin (2015) e atualizado com dados da IETS (2015-2017)

Fonte: Gráfico originalmente publicado por Blondin (2015), no artigo “Status of embryo production in the world”, atualizado com dados da IETS (2015-2017), nos boletins “Embryo Transfer Newsletter”.

Vários fatores contribuíram para que a produção de embriões *in vitro* apresentasse altos índices de crescimento, tais como: a melhoria dos meios utilizados; a viabilização comercial do sêmen sexado, permitindo fornecer ao produtor o sexo desejado em mais de 90% dos embriões produzidos; diminuição da ocorrência da “síndrome do bezerro gigante”; meios mais adequados e elaborados

para a criopreservação dos embriões, permitindo que esses embriões sigam viáveis após protocolos de congelamento lento; viabilização comercial da técnica de Transferência Direta (DT), proporcionando oportunidades de exportação de embriões PIV em todo mundo; aliada à genômica permite a redução do intervalo de gerações. Apesar da PIVE ainda continua sendo uma tecnologia de alto custo, quando comparada a outras biotecnologias, ela também agrega valores comerciais que podem compensar o alto investimento, a exemplo disso, os produtores do setor de gado de leite, podem ter ao seu alcance mais de 90% de embriões fêmeas e os produtores de gado de corte, mais de 90% dos embriões machos (ABE et al., 2002; FARIN et al., 2006; GARNER et al., 2008; MOROTTIA et al., 2014; SHOJAEI et al., 2014; BLONDIN, 2015).

A PIVE apresenta-se como uma alternativa de grande utilidade para prolongar o aproveitamento reprodutivo dos animais. Contudo, algumas limitações devido à diversidade de fatores que influenciam nos resultados finais devem ser melhor estudadas e esclarecidas. Diversos estudos relatam 70% de recuperação de COC's por aspiração folicular (SENEDA et al., 2001; VIANA et al., 2004), e, destes, apenas 10% a 40% são convertidos em embrião (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006; LONERGAN e FAIR, 2008; RIZOS et al., 2008), obtendo-se taxas de gestação não superiores a 50% (PETERSON e LEE, 2003; SIQUEIRA et al., 2009).

Atualmente, o Brasil é responsável por aproximadamente 50% da produção de embriões *in vitro* de todo o mundo. Raças zebuínas de corte são as mais utilizadas no processo da PIVE, e seu resultado de destaque se deve principalmente ao fato de apresentarem maiores quantidades de folículos nos ovários que as taurinas (NEVES et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

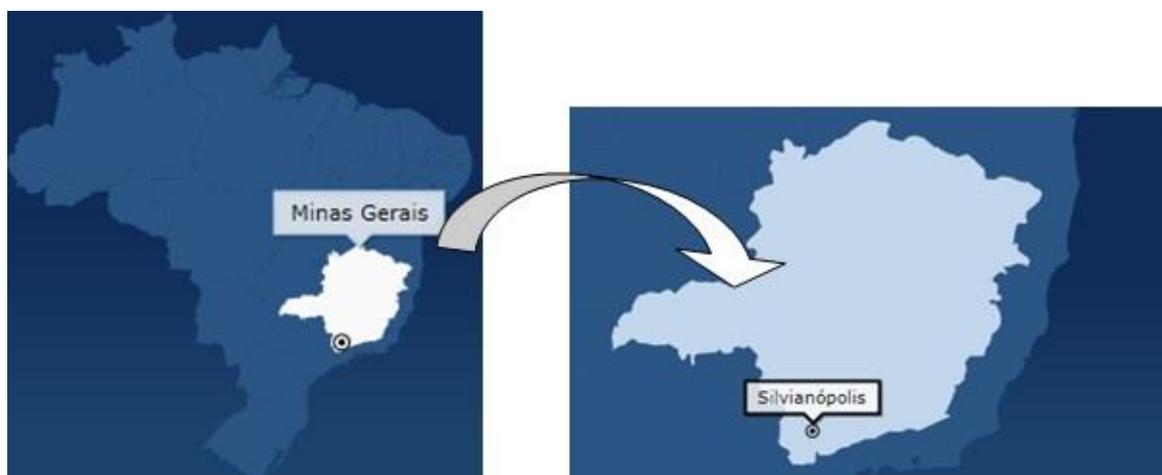
O experimento foi realizado nas propriedades e laboratório da Fazenda Casa Branca Agropastoril (Figura 2) no município de Silvianópolis, Minas Gerais, Brasil, localizada a 22° 01' 44" Sul 45° 50' 06" Oeste (Figura 3), sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CEUA UFRB), com registro de número 23007.032366/2017-30.

Figura 2 – Laboratório da Fazenda Casa Branca Agropastoril



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3 – Mapa ilustrativo referente a localização do município de Silvianópolis-MG



Fonte: Adaptado de <http://pt.db-city.com/Brasil--Minas-Gerais--Silvian%C3%B3polis>

Foram utilizadas 161 vacas zebuínas da raça Brahman (Figura 4) e 167 vacas taurinas das raças Angus (Figura 5) e Simental (Figura 6), com idade entre dois e 17 anos e escore de condição corporal (ECC) entre 3 e 4,5. Os animais foram mantidos em condição de semi-confinamento e confinamento, suplementados com dieta balanceada à base de silagem de milho e sal mineral, além de água *ad libitum*.

Figura 4 – Vacas Zebuínas da Raça Brahman



Fonte: Acervo Casa Branca Agropastoril

Figura 5 – Vacas Taurinas da Raça Angus



Fonte: Acervo Casa Branca Agropastoril

Figura 6 – Vacas Taurinas da Raça Simental



Fonte: Acervo Casa Branca Agropastoril

As vacas selecionadas pelo melhorista da propriedade como doadoras, foram divididas em dois grupos (G) experimentais de acordo com a raça. O G1 (n=161), composto por vacas zebuínas da raça Brahman e o G2 (n=167), composto por vacas taurinas das raças Angus e Simental.

Todas as doadoras foram submetidas à aspiração folicular por um mesmo Médico Veterinário, através da técnica de OPU, utilizando-se um transdutor setorial microconvexo intravaginal de 7,5 MHz, acoplado ao aparelho de ultrassonografia (Mindray®, modelo DP 2200 VET, China). Inserido ao transdutor, havia uma agulha 17G (de único uso e descartada a cada animal), que conduzia ao sistema de bomba de vácuo, com uma pressão de vácuo/vazão ajustada a 18 mL/minuto (Figura 7).

Figura 7 – Ultrassom e sistema de bomba a vácuo



Fonte: Arquivo pessoal

Os animais foram contidos em brete, as fezes foram retiradas do reto e foi feita a limpeza do períneo com água e detergente neutro. Para evitar o desconforto do animal e facilitar manipulação dos ovários, realizou-se anestesia epidural (após antisepsia prévia do local com álcool 70°) com 3mL da associação de cloridrato de lidocaína 2% (2,5mL) com cloridrato de xilazina 0,1% (0,5mL) utilizando agulha

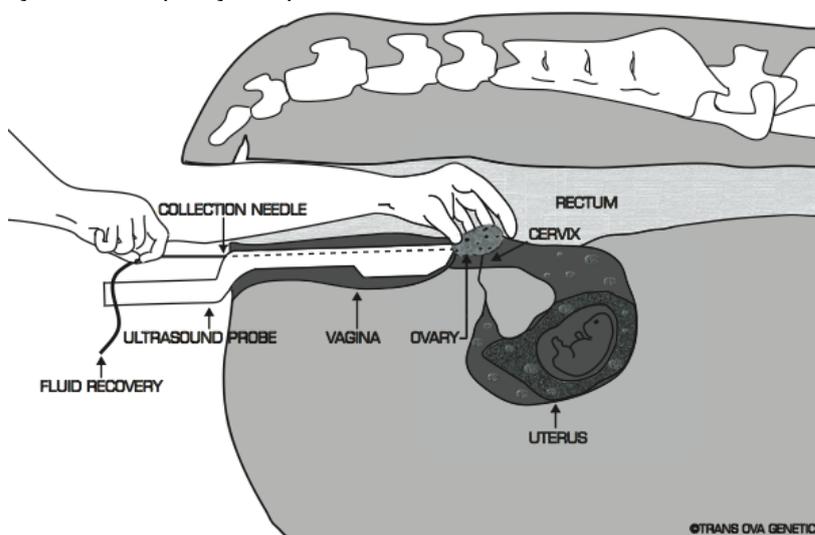
40x12mm (de único uso e descartada a cada animal). Após anestesia, o transdutor foi inserido até o fundo vaginal, e, através de manipulação transretal, os ovários foram posicionados na extremidade do transdutor e todos os folículos antrais visíveis foram aspirados (Figuras 8 e 9). Para o recebimento do conteúdo aspirado e oócitos, utilizou-se tampão fosfato salino à 36°C acrescido de heparina – também utilizado para lavagem da agulha do sistema.

Figura 8 – Manipulação e posicionamento do transdutor na OPU na Fazenda Casa Branca Agropastoril



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 – Ilustração da manipulação e posicionamento do transdutor na OPU



Fonte: Adaptado de <http://www.transova.com/tog-blog/in-vitro-fertilization-embryo-transfer-a-comparison>

Em meio contendo apenas tampão fosfato salino, os oócitos aspirados foram lavados e classificados em grau I, II, III e desnudos quanto a qualidade morfológica por meio do número de camadas do complexo *cumulus oophorus*, conforme descrito por Viana et al. (2004). Em seguida, os oócitos foram envasados em palhetas de 0,25mL contendo meio de maturação e encaminhados ao laboratório de PIVE em transportadora a 38°C. O tempo médio de transporte do local da aspiração para o laboratório foi de no máximo 40 minutos. No laboratório, foram transferidos para placas Corning® (Corning Incorporated, Estados Unidos) 60mm, onde foram lavados de duas a três vezes com meio de maturação e, em seguida, transferidos para uma nova placa Corning® (Corning Incorporated, Estados Unidos) 35mm, onde então, seguiram para maturação *in vitro* (MIV) em incubadora (38,7°C; 99% de umidade; 5% de CO₂) entre 22h e 24h em meio de maturação (9,0mL TCM 199 Earles Salt® Sigma Aldrich, EUA ; 1,0mL de Soro Fetal Bovino® Sigma Aldrich, EUA; 20µL de piruvato; 10µL de FSH; 100µL de LH; 10µL de estradiol; 50µL de amicacina e 4mL de óleo mineral estéril, *Oil for Embryo Culture*® Irvine Scientific, EUA).

Após a MIV, os oócitos foram observados e analisados para confirmação da maturação (expansão das células do *cumulus* e integridade do citoplasma) e, então, foram encaminhados à fertilização *in vitro* (FIV) (10mL de FERT TALP® Life Technologies do Brasil Ltda, Brasil; 0,06g BSA-FAF® *Bovine Serum Albumin Fatty Acid Free* Sigma Aldrich, EUA; 20µL de piruvato; 440µL de Penicilina, Hipotaurina, e Epinefrina - PHE; 110µL de heparina; 50µL de amicacina e 4mL de óleo mineral estéril, *Oil for Embryo Culture*® Irvine Scientific, EUA) entre 18 e 22h. Para a FIV, foram utilizados sêmen convencional e sexado, ambos criopreservados. O sêmen foi descongelado a 35°C por 40 segundos. Espermatozoides vivos e mortos e os diluentes espermáticos, foram separados através do Gradiente Percoll (45% e 90% de Percoll® Sigma Aldrich, EUA) em rotação de 3.200rpm por sete minutos para sêmen convencional e 9.000rpm por cinco minutos para sêmen sexado.

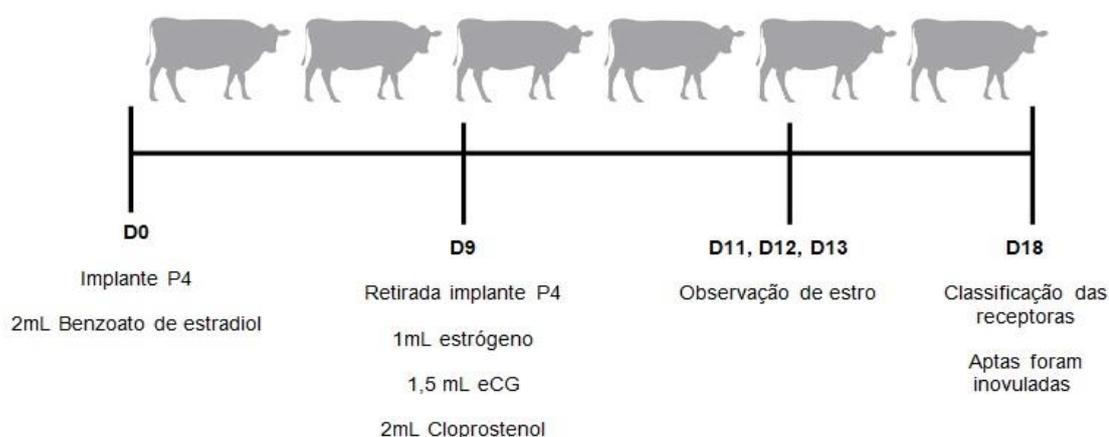
Após o término da FIV, as grandes quantidades de espermatozoides e células em torno do zigoto foram retiradas, permanecendo de duas a três camadas de células do *cumulus*. Os zigotos foram transferidos para placa contendo meio de cultivo (9,3mL de CR-2; 0,05g de BSA-FAF® *Bovine Serum Albumin Fatty Acid Free* Sigma Aldrich, EUA; 500µL de Soro Fetal Bovino® Sigma Aldrich, EUA; 100µL de alanina; 100µL de glicina; 40µL de amicacina) e 4mL de óleo mineral estéril (*Oil for*

Embryo Culture[®] Irvine Scientific, EUA), onde permaneceram durante 7 dias, passando por uma troca de meios (*feeding*) 48h após o início do cultivo *in vitro* (CIV).

Concluída o CIV, os embriões foram analisados e classificados em mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX), segundo os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Os embriões foram envasados em palhetas contendo meio de cultura para manutenção de embriões (Holding plus, Biodux[®], IMV do Brasil, Brasil), encaminhados em transportadora a 36°C, para transferência em receptoras devidamente sincronizadas (Figura 10).

As receptoras (todas mestiças) passaram pelo seguinte protocolo: no D0, receberam implante vaginal de progesterona (CIDR[®], Zoetis, Brasil) e 2mL de benzoato de estradiol intramuscular (IM) (Estrogin[®], Biofarm, Brasil); no D9, o implante de P₄ foi retirado e receberam 1mL de estrógeno (Sincrodiol[®], Ouro Fino, Brasil) IM, 1,5mL de eCG (Novormon[®], Zoetis, Brasil) IM e 2mL de cloprostenol (Ciosin[®], MSD, Brasil) IM; no D11, D12, D13 foram os dias de observação de estro; no D18, as receptoras foram classificadas como aptas ou não em relação ao dia do estro e ao tamanho do corpo lúteo (CL) (CL1: grande; CL2: médio; CL3: pequeno). Apenas as receptoras que apresentaram estro no D6 ou D7 em relação ao dia da fertilização e com CL2 ou CL3, foram classificadas como aptas. As aptas foram inovuladas no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (Figura 10).

Figura 10 – Esquema do protocolo de sincronização utilizado nas receptoras de embriões PIV na Fazenda Casa Branca Agropastoril



Fonte: Arquivo pessoal

Seguindo a rotina da propriedade, após 30 e 45 dias da inovulação dos embriões transferidos a fresco, realizou-se o diagnóstico de gestação (DG) através de palpação retal e ultrassonografia. No DG 30, buscou-se a detecção do corpo lúteo no ovário e/ou a presença de vesícula alantoideana no corpo uterino. Já no DG 45, buscou-se avaliar as perdas embrionárias.

Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Por não atenderem aos pressupostos da normalidade, foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, o qual é utilizado para duas amostras independentes. Utilizou-se o nível de 5% de significância para todas as avaliações e o *Software Statistical Package for the Social Sciences*, versão 23.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados um total de 328 aspirações foliculares, 161 aspirações em fêmeas zebuínas da raça Brahman e 167 em vacas taurinas da raça Angus e Simental. Do total de aspirações, foram obtidos 4.440 oócitos viáveis (13,54%), produzindo 1.284 embriões (29%), dos quais 886 foram transferidos por serem viáveis (69%), resultando em 427 gestações (49%). Esses dados corroboram com os descritos na literatura. Hendriksen et al. (2000) descreveram que apenas 15 a 20% dos oócitos viáveis conseguem atingir estágio de embrião aptos para transferência. A taxa de prenhez deste estudo foi superior a descrita por Nonato Jr et al. (2004) (36,5%), e corrobora com as taxas que variam entre 30 e 51% descritas por HASLER (2000), FARIN et al., (2001) LANE et al. (2003), DIAS et al. (2006), SCHIMIDT (2007), ANDRADE et al. (2012).

A produção de oócitos viáveis foi maior para vacas zebuínas (n=2556), 15,9 oócitos/doadora em comparação às vacas taurinas (n=1903), 11,4 oócitos/doadora (P=0,008) (Tabela 1). Esses resultados corroboram com outros existentes na literatura e são justificados devido às diferenças fisiológicas existentes entre fêmeas zebuínas e taurinas. Vacas *Bos indicus* possuem maior quantidade de pequenos folículos em crescimento nos ovários, e, por conseguinte, um maior número de COC's recuperados por OPU (VIANA et al., 2004), quando comparadas com vacas taurinas (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). Batista et al. (2014), também sugeriram que, vacas *Bos indicus*, devido a maior população de folículos antrais, possuem maior número de oócitos viáveis.

Tabela 1 – Qualidade morfológica dos Complexo *Cumulus* Oócito a partir de doadoras taurinas e zebuínas

Doadoras	Grau I n (%)	Grau II n (%)	Grau III n (%)	Desnudo n (%)	Oócitos viáveis n (%)
Zebuínas	689 (26,96) ^a	1101 (43,08)	681 (26,64) ^a	85 (3,33)	2556 (100) ^a
Taurinas	444 (23,33) ^b	889 (46,72)	509 (26,75) ^b	61 (3,21)	1903 (100) ^b
Valor de P	0,000	0,110	0,010	0,311	0,008

Os dados referem-se ao número de oócitos e (porcentagem). Letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney a 5% de significância.

Fonte: Arquivo pessoal

Carvalho et al. (2007) também observaram que fêmeas zebuínas recrutam maior número de folículos que as fêmeas taurinas. A diferença na quantidade de

folículos recrutados por onda de crescimento folicular, presentes nos ovários, parece ter relação com o sistema IGF. Em um estudo realizado com vacas Brahman, sugeriu-se que estes animais possuem maiores concentrações plasmáticas de IGF-I (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000) e menores concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH), quando comparadas com vacas da raça Angus (ALVAREZ et al., 2000). Mesmo na presença de baixos níveis de FSH, diversos autores também levantaram a possibilidade de que o maior número de folículos presentes no ovário de zebuínos poderia ser em decorrência da elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (ALVAREZ et al., 2000; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BÓ et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009). Viana e Bols (2005) ressaltam que, o recrutamento folicular também pode sofrer interferência da nutrição, categoria, manejo, idade, condição corporal e condições ambientais.

Em relação à qualidade de oócitos viáveis, animais de origem indiana apresentaram maior número de oócitos de grau I (4,28 oócitos GI/doadora versus 2,66 oócitos GI/doadora, $P < 0,0001$) e III (4,23 oócitos GIII/doadora versus 3,0 oócitos GIII/doadora, $P = 0,010$) (Tabela 1). Não houve diferença entre as raças para grau II ($P = 0,110$) e desnudos ($P = 0,311$) (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura, como nos estudos de Gimenes (2010), em que vacas *Bos indicus* apresentaram qualidade oocitária superior a vacas *Bos taurus* e bubalinas.

Um fator que pode ser citado como importante na determinação da qualidade do oócito é a fase da onda folicular em que ele se encontra (SIRARD et al., 1999). Vários fatores determinam o crescimento do oócito dentro do folículo e alguns destes vão influenciar sua viabilidade e competência quando seu desenvolvimento ocorre *in vitro* (de WIT et al., 2000). O dia do ciclo estral é um desses fatores (MACHATKOVÁ et al., 1996).

Para a produção *in vitro*, os oócitos obtidos a partir da OPU, encontram-se em diferentes etapas do desenvolvimento folicular, sendo assim, estão expostos a diferentes concentrações de progesterona, LH, FSH e estradiol (de WIT et al., 2000). Hendriksen et al. (2000) também afirmam em seus estudos que a fase folicular pode determinar a qualidade do oócito, isso porque, quando a OPU é realizada em fases aleatórias do ciclo estral, 85% dos folículos são atrésicos. Outros fatores que também interferem na qualidade do oócito são: o tamanho folicular (LONERGAN et

al., 1994; HENDRIKSEN et al., 2000), o nível de atresia e a influência do folículo dominante (HAGEMANN, 1999). Armstrong et al. (2001), em seus estudos, afirmam que a dieta pode influenciar na função do ovário, na fase de crescimento folicular e na qualidade oocitária.

Segundo Webb et al. (2004), a qualidade dos oócitos recuperados, está relacionada com as condições climáticas. Alguns estudos relacionam a recuperação de oócitos viáveis com a concentração de IGF-I e o balanço energético: animais com balanço energético positivo e maior concentração de IGF-I (devido às maiores quantidades de receptores para IGF-I), como as vacas *Bos indicus*, recuperam maiores quantidades de oócitos viáveis (LUCY, 2000; ARMSTRONG et al., 2001). Já em vacas submetidas ao estresse térmico, com balanço energético negativo, ou seja, com diminuição da ingestão de matéria seca e conseqüentemente, redução dos níveis de glicose, insulina e IGF-I, a qualidade dos oócitos encontra-se comprometida (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

A porcentagem total de embriões diferiu entre os grupos ($P < 0,0001$) (Tabela 2), sendo maior para zebuínos ($n=910$), 5,7 embriões/vaca e menor para taurinos ($n=374$), 2,2 embriões/vaca. De acordo com Sartori et al. (2002), essa diferença na produção se explica devido à porcentagem de embriões produzidos relacionar-se positivamente com a quantidade e a qualidade de oócitos recuperados (SARTORI et al., 2002). Gimenes et al. (2015) relatam em seu estudo que vacas *Bos indicus*, devido ao maior número de COC'S, apresentam maior taxa de embriões produzidos.

Tabela 2 – Qualidade dos embriões produzidos *in vitro* a partir de doadoras taurinas e zebuínas

Doadoras	Mórula	Blastocisto Inicial	Blastocisto	Blastocisto Expandido	Embriões viáveis
Zebuínas	4 (0,44%) ^a	36 (3,96%)	129 (14,18%) ^a	741 (81,43%) ^a	910 (100%) ^a
Taurinas	24 (6,42%) ^b	55 (14,71%)	14 (3,74%) ^b	281 (75,13%) ^b	374 (100%) ^b
Valor de P	0,017	0,149	0,000	0,000	0,000

Os dados referem-se ao número de embriões e (porcentagem). Letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney a 5% de significância.

Fonte: Arquivo pessoal

Em relação à qualidade do embrião, a porcentagem de mórula (zebuínas: 0,02/doadora versus taurinas: 0,14/doadora, $P=0,017$), blastocisto (zebuínas: 0,8/doadora versus taurinas: 0,08/doadora, $P < 0,0001$) e blastocisto expandido (zebuínas: 4,6/doadora versus taurina 1,68/doadora, $P < 0,001$) de vacas zebuínas foi

superior em relação às vacas taurinas (Tabela 2). Não houve diferença apenas para blastocisto inicial ($P=0,149$) (Tabela 2).

Diversos estudos realizados com fêmeas taurinas, demonstram que a menor eficiência na PIVE está relacionada ao estresse térmico (AL-KATANANI e HANSEN, 2002, FERREIRA et al., 2011), que pode influenciar de forma deletéria a dinâmica folicular ovariana e a competência oocitária. Estudos sugerem que os folículos e oócitos ficam comprometidos em relação à qualidade e competência nos estágios iniciais da foliculogênese e podem apresentar efeito deletério na função do ovário.

Nas pesquisas descritas por Roth et al. (2001), devido ao comprometimento por estresse térmico, após o fim deste fenômeno, seriam necessários dois ou três ciclos estrais para reestabelecer as funções dos folículos e qualidade dos oócitos. Já Torres Júnior et al. (2008) informam que o efeito do estresse térmico pode se estender até a fase de produção dos blastocistos (até 105 dias após o fim do efeito).

Devido à maior resistência e adaptabilidade à exposição às elevadas temperatura e umidade e conseqüente maior habilidade à termorregulação, raças *Bos indicus*, parecem ter menores influências dos danos causados pelo estresse térmico do que raças *Bos taurus* (BENNETT, FINCH, HOLMES, 1985, GAUGHAN et al., 1999, HAMMOND et al., 1996).

Viana et al. (2005) também relataram em seus estudos, que a estação do ano (estações quentes) pode influenciar negativamente a produção de embriões *in vivo* em vacas taurinas. Nas pesquisas realizadas por Ferreira et al. (2011), OPU's realizadas durante o verão em vacas taurinas, diminuiram a quantidade de COC's.

A situação reprodutiva também influencia o resultado da PIVE. Estudos como o de Adamiak (2005), sugerem que vacas lactantes ou em lactação tardia, submetidas ao estresse térmico associado a dietas inadequadas (principalmente à alimentação em excesso) também podem influenciar negativamente os resultados da PIVE, principalmente quanto à competência do desenvolvimento dos oócitos.

Vários outros pesquisadores também afirmam que o estado nutricional e metabólico dos bovinos (principalmente desbalanços energéticos) pode ter participação nas alterações de crescimento folicular, liberação de hormônios e qualidade dos oócitos e conseqüentemente, comprometer os resultados da PIVE. A competência oocitária pode ficar comprometida devido a alterações endócrinas (resistência à insulina periférica, hiperinsulinemia, aumento de glicose e IGF-I, que podem levar ao comprometimento no transporte de glicose em células embrionárias)

(WEBB et al., 2004; ADAMIAK, 2005; LEROY et al., 2008; ASHWORTH et al., 2009; BATISTA et al., 2013; SALES et al., 2015).

Outros pesquisadores também observaram que, em temperaturas e umidades mais elevadas, a qualidade dos oócitos de vacas taurinas e seu desenvolvimento ficam comprometidos (BORGES et al., 1998). Enquanto em vacas zebuínas sujeitas à altas temperaturas e umidades, não foi observado comprometimento na qualidade dos oócitos e no seu desenvolvimento (ROCHA et al., 1998).

Camargo et al. (2007) demonstram que, devido à adaptabilidade, vacas *Bos indicus* possuem melhor desenvolvimento embrionário do que vacas *Bos taurus*, quando ambas estão em ambientes tropicais. Em seus estudos com doadoras Gir, foi possível observar que existe correlação entre as condições climáticas, a qualidade de oócitos e a porcentagem de embriões: durante o verão, doadoras Gir pareciam estar sob menos estresse que vacas holandesas, e seus oócitos demonstraram ser mais competentes para o desenvolvimento *in vitro*.

Roth e Hansen (2005) enfatizam que a exposição dos COC's a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro* leva ao comprometimento na maturação nuclear do oócito. Podendo levar também, ao aumento de radicais livres (LAWRENCE et al., 2004), ao comprometimento na síntese de novas proteínas (EDWARDS & HANSEN, 1996, 1997), e até mesmo à apoptose do oócito (ROTH e HANSEN, 2004), culminando no comprometimento da capacidade dos oócitos em se desenvolverem até estágio de blastocisto (EDWARDS et al., 1997).

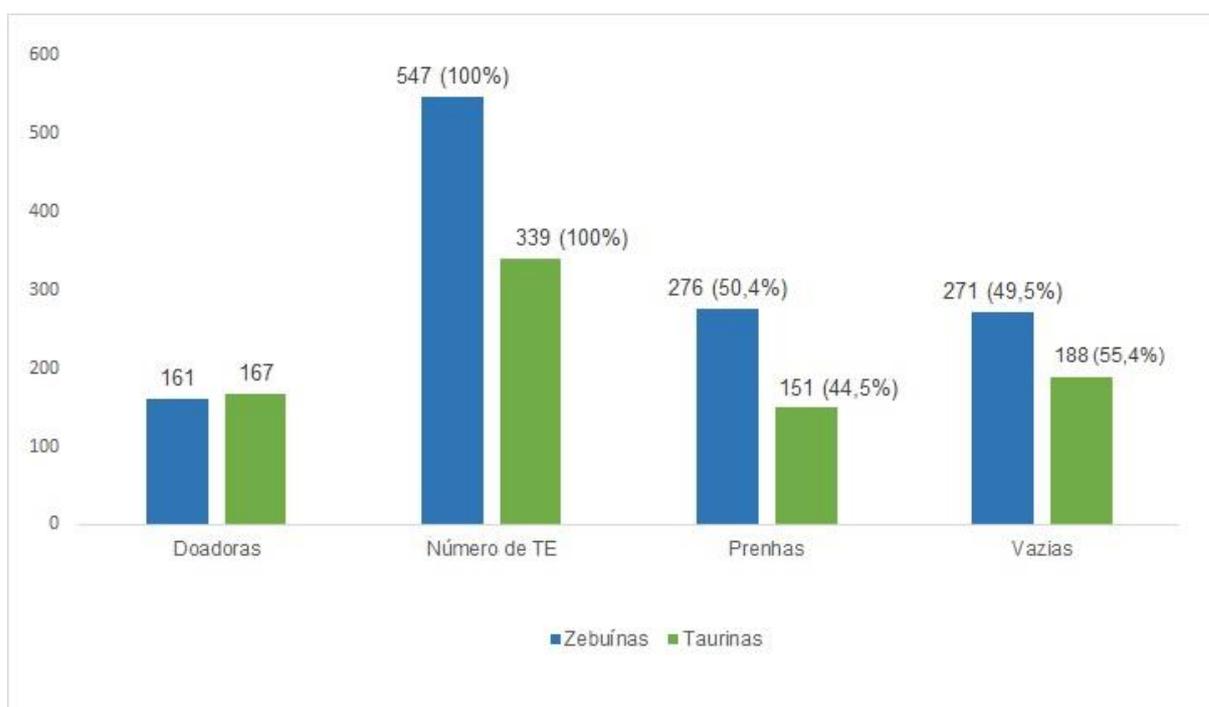
Nas pesquisas desenvolvidas por Al-Katanani (2002) com vacas taurinas, observou-se que, no verão, as doadoras aspiradas, apresentaram comprometimento no desenvolvimento até blastocisto em comparação ao período do inverno, comprovando assim, que a exposição do oócito e do embrião a altas temperaturas influencia no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Importante destacar que, no presente estudo, as vacas doadoras taurinas se encontravam em ambientes climatizados, com regulagem de temperatura. Além disso, os animais encontravam-se em pequenos lotes, o fornecimento de água foi realizado *ad libitum* e o fornecimento de concentrado e alimentação foi feito na parte da noite ou início da manhã, quando a temperatura se encontra a mais baixa do dia, e, por isso, efeitos do estresse térmico, apesar de descrito na literatura como influenciador da qualidade tanto de oócitos quanto de embriões, não foi analisado no presente estudo. O que não significa que não houve influência de tais fatores.

Também não foi analisado no presente estudo o escore corporal e nem a situação reprodutiva (lactantes, vazias, prenhes) em que as fêmeas doadoras se encontravam.

A taxa de prenhez não diferiu entre os dois grupamentos genéticos ($P > 0,05$) (Figura 11), zebuínos: 1,71/doadora versus taurinos: 0,90/doadora e foi superior à encontrada por Nonato Jr. et al. (2004), que obtiveram 36,5%. Entretanto, a taxa de prenhez do presente estudo coincide com outros resultados encontrados na literatura que relatam taxa de prenhez de receptoras bovinas com embriões PIV variando entre 30 a 51% (HASLER, 2000; FARIN et al., 2001, LANE et al., 2003; DIAS et al., 2006; SCHIMIDT, 2007; ANDRADE et al., 2012). Niemann et al. (2002) e Rheinganz (2000) citaram índices de até 50% de prenhez em seus estudos.

Figura 11 – Taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos PIV



Fonte: Arquivo pessoal

As taxas de gestação de receptoras de embriões PIV são inferiores, quando comparas a embriões produzidos *in vivo* (HASLER et al., 2003). Isso pode ser explicado devido ao mecanismo de reconhecimento materno da gestação dos embriões PIV ser mais tardio (FARIN et al., 2001). A luteólise inicia entre o 150º e 170º dia do ciclo estral. Se durante esse período, o embrião não produzir uma

concentração adequada de interferon-tau, então, não irá ocorrer o reconhecimento materno da gestação (BINELLI et al., 2001).

Alguns pesquisadores citam que a maior taxa de prenhez durante a TE de embriões PIV pode estar relacionada a embriões de estágios de desenvolvimento inicial (HANEKAMP, 1999; PEIXOTO et al., 2007; BÓ et al., 2012). Contudo, estágios de desenvolvimento muito precoces ou tardios podem contribuir para uma baixa taxa de prenhez, como informa Jainudeen et al. (2004).

Os embriões de ruminantes têm desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* parecido até o estágio de oito células, contudo, a partir desse estágio, embriões PIV, se desenvolvem mais lentamente (THOMPSON, 2000; FONTANIER-RAZZAQ et al., 2001). A fase de cultivo *in vitro* também pode exercer efeito sobre o metabolismo embrionário e alterar a qualidade do embrião (RIZOS et al., 2002). Hasler et al. (2003) afirmam que as diferenças metabólicas e bioquímicas também podem afetar as taxas de prenhez após a inovulação. Ademais, após a inovulação, a taxa de sobrevivência do embrião pode sofrer a influência de diversos fatores: anormalidades cromossômicas, idade e qualidade dos embriões inovulados, local e método da transferência, estresse calórico, sincronização entre doadoras-receptoras, estado nutricional e concentrações de progesterona sérica nas receptoras (HANSEN e EALY, 1991).

A sincronia do embrião com a receptora também é outro fator que deve ser levado em conta e que pode influenciar diretamente a taxa de prenhez (HANSEN e EALY, 1991).

6. CONCLUSÃO

O efeito raça interfere nos resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, uma vez que vacas zebuínas apresentaram melhores resultados quando comparadas as vacas taurinas. Faz-se necessário estudos mais aprofundados acerca de outros fatores que podem influenciar a PIVE de tais grupamentos genéticos, como: estágio do ciclo estral das doadoras, análises metabólicas, dados de temperatura e umidade, fator touro, efeito receptora e manejo.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serumcontaining media. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.57-66, 2002.
- ADAMIAK, S.J. et al. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol. Reprod.**, v.73, p.918-926, 2005.
- AL-KATANANI, Y.M.; HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, n.2, p.174-80, 2002
- AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competente in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 396, 2002.
- ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim. Sci.** v.78, p.1291-1302, 2000.
- ANDRADE, G.A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.66-69, 2012.
- ARMSTRONG, D.G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1624-1632, 2001.
- ASHWORTH C.J. et al. The impact of *in utero* nutritional programming on small ruminant performances. In Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats. 12th Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition, 11–13 October 2007, Thessaloniki, Greece (eds Papachristou T. G., Parissi Z. M., Ben Salem H., Morand-Fehr P., editors.). **Options Méditerranéennes** (Series A: Mediterranean seminars Number 85), p.337–349, 2009.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BATISTA, A.M. ET AL. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, V.141, N.3-4, P.142-147, 2013.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J. N. de S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.
- BATISTA, E. O. et al. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reprod. Domest. Anim.**, v.49, n.3, p.448-52, 2014.

BENNETT, I.L.; FINCH, V.A.; HOLMES, C.R. Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v.13, p.227-236, 1985.

BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world P. **Anim. Reprod.**, v.12, n.3, p. 356-358, 2015.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.307-326, 2003.

BÓ, G.A. et al. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.24, p.272-277, 2012.

BONI, R. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.

BORGES, J.M.L. et al. Influência das gonadotrofinas na regulação da maturação nuclear de oócitos equinos. **Ciência Rural**, v.28, n.2, p.293-297, 1998.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

CAMARGO, L.S. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v.68, p.626-632, 2007.

CARVALHO, J.B.P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-75, 2007.

CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.98, p.189-96, 2006.

de RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. **Theriogenology**, v.60, n.6, p.1139-51, 2003.

de WIT, A.A.; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **J Anim. Sci.**, v.78, n.5, p.1277-83, 2000.

DIAS, C.C. et al. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.412, 2006.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VANTOL, H.T.M.; WILLEENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação oocitária em bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.115-130, 2006.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, n.2, p.138-45, 1997.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, n.2, p.341-6, 1996.

FARIN, P.W. et al. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.151-170, 2001.

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitroproduced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178-191, 2006.

FERRREIRA, R. et al. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, v.52, n.12, p.4957-4965, 2011.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.143-152, 2007.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**. v.47, p.1489-1505, 1997.

FONTANIER-RAZZAQ, N. et al. DNA damaging agents increase gadd153 (CHOP-10) messenger RNA levels in bovine preimplantation embryos cultured in vitro. **Biol. Reprod.**, v.64, n.5, p.1386-91, 2001.

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

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. **Anim. Breed. Abstr.**, v.58, p.697-707, 1990.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTI, G. Et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZAZARI, G. Practical aspects of lvm/lvf in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GARNER, D. L.; SEIDEL, G.E JR. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v.69, p.886-895, 2008.

GAUGHAN, J. B. et al. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 2398–2405, 1999.

GIMENES, L.U. et al. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Sci. Vet.**, v.33, supl.1, p.210, 2005.

GIMENES, L. U. Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda do crescimento folicular. 2010, 122f. **Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo**, Departamento de Reprodução Animal, 2010.

GIMENES, L.U. ET AL. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *bos indicus*, *bos taurus*, and *bubalus bubalis*. **THERIOGENOLOGY**, V.83, N.3, P. 385-393, 2015.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.**, v.65, n. 3, p. 638-47, 2001.

GINTHER, O.J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.239-257, 2003.

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

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

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2ed, 2008.

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

HAGEMANN, L.J. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Mol. Reprod. Dev.**, v.53, n.4, p.451-458, 1999.

HAMMOND, A.C. et al. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J Anim. Sci.**, v.74, p.295-303, 1996.

HANEKAMP, W.J.A. Transfer of beef embryos in dairy cows: influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.39, p.459-463, 1999.

HANSEN, P.J.; EALY, A.D. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of pregnancy in cattle. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.1, p.108-119, 1991.

HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.81-91, 2000.

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

HENDRIKSEN, P.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p. 11-20. 2000.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 35, n.1, p. 1-47, 2017.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 34, n.1, p. 1-47, 2016.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 33, n.1, p. 1-63, 2015.

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

JAINUDEE, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Indução da ovulação, Produção e Transferência de Embriões. E.S.E. Hafez, B. Hafez (Eds.), **Reprodução Animal** (7th ed.), Manole, Barueri, p. 409-434, 2004.

LANE, M. et al. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v.60, p.407-419, 2003.

LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; GODKIN, J.D. et al. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.8, p.2449-2454, 2004.

LEROY, J.L. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus

luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reprod Domest Anim.**, v.43, n.5, p.612-22, 2008.

LONERGAN, P. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.37, n.1, p.48-53, 1994.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.146-52, 2000.

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

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.1635-1647, 2000.

LUCY, M.C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim. Sci.** v.70, p.3615-3626, 1992.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801-810, 1996.

MELLO, R.R.C. et al. Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. **B Anim. Husb.**, v.73, p.88-93, 2016.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v.66, p.929-936, 2006.

MONTEIRO, F.M. et al. Influence of Superovulatory Protocols on In Vitro Production of Nelore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.860–864, 2009.

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

MOROTTIA, F. et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, v.81, p.696-701, 2014.

MUKASA-MUGERWA, E.A. **Review of Reproductive Performance of Female Bos indicus (Zebu) Cattle**. Monograph n. 6, ILCA, Addis Ababa, Ethiopia, 101-104, 1989.

NEVES, K.A.L. **Effect of interval between insemination and ovulation in conception rates in Nelore cows timed AI with sex-sorted** [in Portuguese]. São Paulo, SP: University of São Paulo. Dissertation. 2010.

NIEMANN, H. et al. Gene expression patterns in bovine in vitro – produced and nuclear transfer – derived embryos and their implications for early development. **Cloning and stem cells**, v.4, p.29-38, 2002.

NONATO Jr. et al. Produção de embriões em vacas nelore com a utilização associada de FIV e TE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., Barra Bonita, 2004, **Anais...** Barra Bonita: Acta Scientiae Veterinariae, v.32. p.95, 2004.

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulusoocyte complexes during oocyte maturation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.27, p.179-795, 2004.

PEIXER MA, Souza RV, Rumpf R, De Bem AR, Neto MAP. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargen. **Zootecnia**, v. 32, p. 49, 1994.

PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Effect of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.**, v.58, p.567-574, 2006.

PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.67, p.287-292, 2007.

PETERSON, A.J.; LEE, R.S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.687- 697, 2003.

PINHEIRO, O.L. et al. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2a or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.667-681, 1998.

RATH D.; JOHNSON L.A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.338-346, 2008.

RHEINGANTZ, M.G.T. Fecundação in vitro, criopreservação de ovócitos e embriões e sexagem de embriões bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.24, p.21-29, 2000.

RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.265-277, 1995.

RIZOS, D. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, n.2, p.234-48, 2002.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 44-50, 2008.

ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.657-665, 1998.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

ROTH, Z. et al. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v.122, n.5, p.737-44, 2001.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation. **Biology of reproduction**, v.71, p.1898–1906, 2004.

SALES, J.N. et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **J Dairy Sci.**, v.98, n.5, p.3086-99, 2015.

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

SARTORI, R. et al. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2803-2812, 2002.

SARTORELLI, E.S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAVIO, J. D. et al. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p.915-29, 1991.

SAVIO, J.D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod. Fertil.** v.83, p.663-671, 1988.

SCHMIDT, M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.13, 2007.

SENEDA, M.M. et al. Aspiração folicular transvaginal sem estímulo hormonal em vacas holandesas. **ARS veterinária**. v. 17, n. 1, p. 11-16, 2001.

SHOJAEI SAADI. H. A. et al. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. **BMC Genomics**, v.15, p. 88, 2014.

- SILVA, A.P.T.B. et al. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção in vitro de embriões bovinos. **B Anim. Husb.** v.72, p.51-58, 2015.
- SIMPSON, R.B. et al. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **J Reprod Fertil.** v.102, p.483-492, 1994.
- SIQUEIRA, L.G. et al. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed time embryo transfer. **Theriogenology.** v.72, n.7, p.949-958, 2009.
- SIRARD, M. A. et al. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology,** v.51, p.699–708, 1999.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.,** v.39, p.308-317, 1988.
- THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.,** v.60-61, p.263-275, 2000.
- TORRES-JÚNIOR, J.R.S. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology,** v. 69, p.155-166, 2008.
- VAN WAGTENDONK-De LEEUW, A. M. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology,** v.65, p.914-925, 2006.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.32, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.33, n.1, p.1-4, 2005.
- VIANA, J.H.M. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.35, p.2501-2509, 2000.
- VIANA, J.H.M. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 38, p. 661-s674, 2010. (Suplemento 2)
- VIANA, J.H.M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science,** v.1-2, p.1-12, 2004.

WEBB, R. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.**, v.82, E-Suppl:E63-74, 2004.

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.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility. **Veterinary Clinical Of North American: Food Animal Practice**, v.8, n.1, p.57-89, 1992.