



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

LUIZ FERNANDO RODRIGUES FÉRES

**EFEITO DA EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA
PROBABILIDADE DE PRENHEZ E INFLUÊNCIA DA ENDOGAMIA NA
PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM UM REBANHO DA RAÇA GIR**

Niterói
2015

LUIZ FERNANDO RODRIGUES FÉRES

**EFEITO DA EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA
PROBABILIDADE DE PRENHEZ E INFLUÊNCIA DA ENDOGAMIA NA
PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM UM REBANHO DA RAÇA GIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: *Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão*

Coorientador: *Dr. João Henrique Moreira Viana*

Niterói

2015

F349 Féres, Luiz Fernando

Efeito da eficiência da produção *in vitro* de embriões na probabilidade de prenhez e influência da endogamia na produção de oócitos em um rebanho da raça Gir. / Luiz Fernando Féres; orientador Felipe Zandonadi Brandão. – 2015.

89f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) - Universidade Federal Fluminense, 2015.
Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. Bovinos. 2. Reprodução. 3. Fertilização In Vitro. 4. Técnicas reprodutivas. 5. Melhoramento genético. 6. Endogamia. I. Título.

CDD 591.16

**EFEITO DA EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA
PROBABILIDADE DE PRENHEZ E INFLUÊNCIA DA ENDOGAMIA NA
PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM UM REBANHO DA RAÇA GIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 25 de maio de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. João Henrique Moreira Viana – Coorientador
Embrapa Gado de Leite

Dra. Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Luiz Altamiro Garcia Nogueira
Faculdade de Veterinária – UFF

Niterói
2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por tudo o que Ele representa para mim.

Ao Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, pela oportunidade que me propiciou ao longo de toda graduação e pós-graduação. Para mim, é um exemplo de caráter e profissionalismo que pretendo seguir. Obrigado por sua confiança e constante incentivo.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana, pela orientação, por toda sua ajuda na dissertação e nas análises deste estudo.

À Fernanda, pela fundamental ajuda na realização da estatística deste experimento. Obrigado pela paciência em me explicar as análises e os resultados.

Aos pesquisadores Dra. Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto e Dr. Frank Bruneli da Embrapa Gado de Leite, pela colaboração no desenvolvimento das análises neste estudo e ensinamentos.

À Livia, minha maior incentivadora, que esteve sempre presente na minha vida nestes últimos anos. Obrigado pelos seus conselhos, pela paciência e por todos momentos que passamos juntos. Sem você não teria conseguido passar por esta etapa. Você é tudo na minha vida.

Aos meus pais, Simeão e Tereza pelo amor incondicional e por terem acreditado em mim. Obrigada por vocês terem assumido meus sonhos como seus, mesmo lhes custando o sacrifício de suas realizações.

Ao meu irmão, João Paulo, meu grande amigo e grande companheiro. Tenho grande carinho por você, e sempre vou estar ao seu lado.

À minha avó Dilene, por suas constantes orações e carinho. Sempre preocupada comigo. Obrigado por ser essa avó maravilhosa que você é.

Ao meu avô Nona, um exemplo de marido, de pai, de avô e de pessoa.

À minha avó Emília, uma pessoa maravilhosa que teve grande participação na minha formação como pessoa.

Ao meu avô Antônio, pelos ensinamentos, pelo caráter e pela formação da minha família.

Ao proprietário das Fazendas do BASA, Sr. Evandro do Carmo Guimarães, uma grande pessoa, apaixonada pela seleção do gado bom. Obrigado pela oportunidade de trabalho, pela confiança e grande amizade.

Aos professores de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense que contribuíram para minha formação.

A CAPES, pela bolsa de estudos e pelo financiamento deste trabalho.

A todos que de alguma forma participaram da minha conquista. MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

Diante da importância da raça Gir e das biotécnicas da reprodução animal para o melhoramento genético dessa raça, tornam-se necessários estudos que busquem melhorar os índices de eficiência da técnica e investigar fatores genéticos e não genéticos que possam influenciar positivamente a produção de embriões. A relação entre a eficiência dos sistemas de produção de embriões e os resultados de prenhez, no entanto, permanecem controversos. Além disso, a produção e a qualidade de oócitos recuperados por meio da aspiração folicular são influenciados por fatores genéticos, como a endogamia. O objetivo desse estudo foi avaliar a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro* derivados de lotes de doadoras da raça Gir com diferentes índices de eficiência relativa e, em seguida, estimar parâmetros genéticos e avaliar os efeitos da endogamia sobre a quantidade e qualidade de oócitos obtidos de doadoras da raça Gir por meio de aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Os resultados sugerem que não há nenhuma relação entre o número médio ou a qualidade do COC recuperado por OPU, a eficiência de PIVE e a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro*. Também observou-se que é possível alcançar o progresso genético para as características reprodutivas em bovinos da raça Gir por meio da seleção.

Palavras-chave: Aspiração folicular, Endogamia, *Bos Indicus*, Índices de Eficiência, Oócitos.

ABSTRACT

Given the importance of Gir cattle and biotechnologies of animal reproduction for genetic improvement of the breed, studies are necessary to improve the efficiency indices of the technique and to investigate genetic and nongenetic factors that positively influence the production of embryos. The relationship between the efficiency of embryo production systems and the results of the pregnancy, however, remains controversial. Furthermore, the yield and quality of oocytes retrieved by follicular aspiration are influenced by genetic factors, such as inbreeding. The aim of this study was to evaluate the probability of pregnancy of *in vitro* produced embryos derived from lots of Gir donor with different levels of relative efficiency and then to estimate genetic parameters and to evaluate the effects of inbreeding on the quantity and quality oocytes from Gir donor by follicular aspiration guided by ultrasound. The results suggest that there is no relationship between the average number or quality of the COC recovered by OPU, the IVP efficiency and the probability of pregnancy in vitro produced embryos. It was also observed that it is possible to achieve genetic progress for reproductive traits in cattle Gir through the selection.

Keywords: Follicular aspiration, Efficiency ratios, Gir, Inbreeding, oocyte.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Número total, média e erro padrão do número de oócitos viáveis (GI, GII e GIII) e inviáveis recuperados em 605 sessões de aspiração folicular em doadoras da raça Gir.....	42
Tabela 2. Número total, média e erro padrão de oócitos recuperados, oócitos maturados, embriões clivados, embriões produzidos, embriões transferidos e gestações obtidas referentes a 605 sessões de OPU em doadoras da raça Gir.....	44
Tabela 3. Número total, média e erro padrão de oócitos recuperados, oócitos viáveis, porcentagem de oócitos viáveis em relação ao número total de oócitos recuperados, oócitos de grau I, porcentagem de oócitos grau I em relação ao número de oócitos viáveis, embriões produzidos e porcentagem de embriões produzidos em relação ao número de oócitos maturados subdivididos entre os quartis.....	46
Tabela 4. Classificação de doadoras estratificadas em faixas de acordo com a porcentagem de oócitos viáveis em relação ao número totais de oócitos recuperados por sessão de OPU e comparação da taxa de prenhez.....	47
Tabela 5. Classificação de doadoras estratificada em faixas de acordo com a porcentagem de oócitos de grau I em relação ao número de oócitos viáveis recuperados por sessão de OPU e comparação da taxa de prenhez.....	48
Tabela 6. Classificação de doadoras com estratificação de acordo com a taxa de clivagem em relação ao número de oócitos maturados no laboratório e comparação da taxa de prenhez.....	49
Tabela 7. Classificação de doadoras estratificadas em faixas de acordo com a taxa de blastocistos em relação ao número de embriões clivados no laboratório e comparação da taxa de prenhez.....	49

Capítulo 2

Tabela 1. Estatísticas descritivas para o intervalo de coleta, idade, coeficiente de endogamia, oócitos viáveis e oócitos inviáveis.....	78
Tabela 2. Valores da função de verosimilhança (-2Ln(L)) e do critério de informação de Akaike (AIC) nas análises de características de qualidade e quantidade de oócitos, em modelos estatísticos sem ou com a inclusão das covariáveis efeito da endogamia linear e quadrática.....	80
Tabela 3. Estimativas de variâncias genéticas aditivas ($\hat{\sigma}_a^2$), de ambiente permanente ($\hat{\sigma}_{pe}^2$) e residuais ($\hat{\sigma}_e^2$) e herdabilidades (\hat{h}^2) para características de oócitos viáveis, inviáveis e totais, em modelos estatísticos sem ou com a inclusão da covariável coeficiente de endogamia linear e linear+quadrático....	86
Tabela 4. Correlações genéticas (acima da diagonal) e correlações residuais (abaixo da diagonal) para as características oócitos viáveis, inviáveis e totais recuperados de aspiração de doadoras da raça Gir.....	88

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Quadro com a classificação oocitária de acordo com a composição do *cumulus oophorus*. Adaptado de Ferraz, 2008..... 29

Capítulo 1

Figura 1. Número de oócitos inviáveis e viáveis (classificados em grau I, II ou III) produzidos por meio da OPU..... 42

Capítulo 2

Figura 1. Efeito da endogamia no número de oócitos totais..... 82

Figura 2. Efeito da endogamia no número de oócitos viáveis..... 83

Figura 3. Efeito da endogamia no número de oócitos inviáveis..... 83

Figura 4. Efeito da idade no número de oócitos totais..... 84

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
BST	Somatotropina Bovina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CYP17	17 α -hidroxilase/C17-20-liase
CL	Corpo lúteo
COC	Complexo cumulus-oócito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
i.m.	Via intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
MHz	Mega-Hertz
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOET	Múltipla ovulação e transferência de embrião
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
P4	Progesterona
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embrião
PNMGGL	Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético do oviduto
TCM	Tissue Culture Medium
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 FISIOLOGIA OVARIANA EM BOVINOS.....	13
2.2 RAÇA GIR NO CONTEXTO DA PECUÁRIA LEITEIRA BRASILEIRA.....	18
2.3 ENDOGAMIA.....	19
2.4 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	21
2.5 PUNÇÃO FOLICULAR E CLASSIFICAÇÃO OOCITÁRIA.....	27
Capítulo 1	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	36
3. HIPÓTESE.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
4.2 LOCALIZAÇÃO, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E MANEJO NUTRICIONAL E SANTITÁRIO.....	37
4.3 DOADORAS.....	37
4.4 PUNÇÃO FOLICULAR (OPU) E RECUPERAÇÃO DE COC'S.....	38
4.5 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	39
4.6 RECEPTORAS DE EMBRIÕES E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	40
4.7 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	40
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Capítulo 2	70
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. OBJETIVOS	75
2.1 OBJETIVO GERAL.....	75
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
3. HIPÓTESE	75
4. MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	76
4.2 LOCALIZAÇÃO, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO.....	76
4.3 DOADORAS.....	76
4.4 ARQUIVO DE PEDIGREE.....	77
4.5 PUNÇÃO FOLICULAR (OPU) E RECUPERAÇÃO DE COC'S.....	77
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. ANEXOS	94
8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO.....	94

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético é impulsionado principalmente pela necessidade do aumento da produtividade em sistemas de produção de leite e corte, visto que o crescimento populacional demanda cada vez mais proteína de origem animal. Por meio da produção *in vitro* de embriões é possível gerar um grande número de descendentes de doadoras geneticamente superiores, tornando possível o aumento da intensidade de seleção e a diminuição do intervalo de gerações, dois parâmetros importantes que afetam o progresso genético.

O processo de seleção da raça Gir é recente e esta possui características importantes para as condições tropicais. Assim, é uma alternativa para incrementar a pecuária leiteira, seja como raça pura ou utilizada como base para a produção do Girolando.

Apesar dos avanços obtidos e de já estar sendo rotineiramente utilizada há mais de 10 anos no Brasil, os índices da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem permanecido estáveis.

Diante da importância do Gir e das biotécnicas da reprodução animal para o melhoramento genético da raça, são necessários estudos com objetivo de melhorar os índices de eficiência da técnica e investigar fatores genéticos e não genéticos que possam influenciar positivamente a produção de embriões.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FISIOLOGIA OVARIANA EM BOVINOS

No terço médio da gestação, o ovário do feto bovino já está repleto de oogônias, que estão contidas em folículos primordiais. Ao nascimento, a fêmea possui em torno de 150.000 folículos primordiais que, gradualmente, deixam seu estado de latência e iniciam seu desenvolvimento. Ao chegar à puberdade, esse número diminui ficando entre 12.000 a 86.000 e, destes, somente poucos chegam à ovulação durante a vida da fêmea, enquanto o restante sofre atresia (CAMPBELL et al., 1995).

O folículo é uma unidade morfofuncional do ovário, constituída por oócitos circundados por células somáticas da granulosa e da teca. A função desses folículos é proporcionar o ambiente ideal para viabilidade, crescimento e maturação oocitária. Folículos que contêm dois ou mais oócitos foram descritos nos ovários de fêmeas adultas de várias espécies de mamíferos, sendo denominados de folículos multioócitos (SILVA-SANTOS et al., 2011).

A foliculogênese refere-se ao crescimento desses folículos e envolve uma série de mudanças em componentes da parede folicular como células da teca, granulosa e oócito. Essa se dá simultaneamente à oogênese, sendo procedente e concluída com a ovulação do oócito e posterior fecundação (FAIR et al., 1997).

A população folicular dos ovários é bastante heterogênea, sendo formada de acordo com o grau de evolução dos folículos. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90-95% de toda a população folicular, são diferenciados de acordo com o número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito imaturo e constituídos de folículos primordiais, intermediários, primários e secundários. A progressão do folículo primário para o estágio de folículo terciário (folículo antral) leva, aproximadamente, 60 dias e cerca de dois ciclos estrais são necessários para um folículo crescer da formação do antro até o tamanho pré-ovulatório (LUSSIER et al., 1987).

Os folículos primordiais são os primeiros a serem formados, sendo os menores encontrados no ovário e circundados por uma camada de células da pré-granulosa de formato epitelial pavimentoso. De acordo com o crescimento, estes folículos sofrem ativação, ocorrendo multiplicação das células da granulosa e

transformação morfológica em células de formato epitelial pavimentoso para formato epitelial cúbico (FAIR et al., 1997).

O folículo secundário é caracterizado pela segunda camada de células da granulosa com forma cúbica, pela deposição dos componentes da zona pelúcida ao redor do oócito, síntese dos grânulos corticais no citoplasma dos oócitos, reorganização e ativação nucleolar, além da primeira detecção de síntese de RNA (FAIR et al., 1997).

A transição do folículo secundário para o estágio de folículo terciário é marcada pela continuação da proliferação e diferenciação das células somáticas ao redor do oócito para formar a teca interna e externa, a lâmina basal e a formação da cavidade antral. Uma vez formado, o antro aumenta rapidamente e as células da granulosa proliferam-se e diferenciam-se em células da granulosa murais e células do *cumulus* que circundam o oócito (FAIR et al., 1997). Essas células do *cumulus* são ligadas intimamente ao oócito por meio das junções do tipo *gap*, e são responsáveis pelo crescimento e maturação do oócito (YEO et al., 2009).

O desenvolvimento folicular é caracterizado pela presença de ondas com início em diferentes épocas durante o ciclo estral, as quais estão presentes em fêmeas com duas semanas de idade (EVANS et al., 1994).

Na fase pré antral, a regulação local é predominante, destacando-se o papel ativo do oócito e sua interação com as células da granulosa (BURATINI, 2007). No início do recrutamento folicular da fase antral, as concentrações de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) secretadas pelo hipotálamo estimulam as células gonadotróficas da hipófise anterior a sintetizar e secretar hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O oócito continua a crescer desde a ativação dos folículos pré-antrais até os folículos atingirem cerca de 3 mm de diâmetro. Após esse tamanho folicular não é mais observado aumento do tamanho oocitário e apenas o folículo cresce até chegar ao estágio pré-ovulatório (CAIXETA et al., 2009).

Durante cada onda do *pool* de folículos em desenvolvimento, um é selecionado, torna-se maior e passa a dominar os demais. A partir da fase antral, quando os folículos têm em torno de 3 mm de diâmetro, se tornam dependentes do suporte gonadotrófico, sendo que o pico de FSH é o principal fator responsável pelo crescimento desses folículos até ocorrer o desvio. Antes de ocorrer o desvio, todos

os folículos em crescimento são capazes de se tornar dominantes. Isso pode ser observado quando o FSH exógeno é administrado no início da onda, estimulando muitos folículos a atingir o diâmetro dos folículos dominantes ou, ainda, quando o folículo dominante é destruído (GINTHER et al., 2002).

No período de recrutamento, baixas concentrações circulantes de LH no início da onda induzem a expressão de 17 α -hidroxilase/C17-20-liase (CYP17) nos folículos em crescimento e há biossíntese de andrógenos nas células da teca, além da expressão de receptor de lipoproteína de baixa densidade, que fornece colesterol para a biossíntese de esteróides. A produção aumentada de andrógenos fornece o substrato para a aromatase, permitindo que as células da granulosa sintetizem estrógeno (DUNN e MAYO, 2006).

O aumento das concentrações de estradiol altera o padrão de secreção de GnRH pois ocorre a produção de substâncias – por exemplo, inibina, ativina, folistatina (um regulador negativo da ativina) - que influenciam diretamente o desenvolvimento folicular, sendo que a inibina suprime a secreção de FSH pela hipófise anterior (RAJKOVIC et al., 2006).

Aparentemente, essa supressão de FSH é o fator responsável pelo mecanismo que provoca o desvio das taxas de crescimento entre os folículos dominantes e subordinados. O folículo dominante continua a crescer por uma mudança na dependência de FSH para LH e pela capacidade de melhor resposta para baixas concentrações de FSH circulantes. Por outro lado, os folículos subordinados são dependentes de FSH e, portanto, sendo privados deste hormônio, iniciam o processo de atresia. O efeito deletério da presença de folículos dominantes funcionais sobre a qualidade morfológica e capacidade de desenvolvimento *in vitro* de oócitos é bem conhecido (LONERGAN et al., 2008). O FSH atinge concentrações basais no dia do início do desvio e se mantém baixo pelos próximos 3 ou 4 dias, até o surgimento de um novo pico. Um novo aumento de FSH no início da onda seguinte pode ser atribuído à perda do efeito de substâncias inibidoras secretadas pelo folículo dominante.

Segundo Ginther et al. (1997), o folículo que se tornou dominante é aquele de maior tamanho no momento do desvio. O primeiro folículo a chegar a uma fase decisiva em que os receptores de LH nas células da granulosa são expressos, se torna o dominante. Quando as concentrações de progesterona diminuem devido à

luteólise durante o ciclo, os folículos dominantes que expressam receptores de LH e são expostos a concentrações crescentes dessa gonadotrofina continuam seu crescimento até a ovulação. Impulsionado pela liberação de GnRH, o pico pré-ovulatório de LH induz a luteinização, acarretando na diferenciação das células da teca e granulosa em células lúteas, expansão do complexo *cumulus*-oócito (COC), maturação final dos oócitos (que progridem até a metáfase II), ovulação e mudanças no ambiente endócrino folicular da dominância do estrogênio para a dominância da progesterona no fluido folicular (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Neste momento pré-ovulatório, altas concentrações de estrogênio no microambiente folicular podem ter impacto na maturação e competência oocitária (GEARY et al., 2012).

Resultados de estudos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) sugerem que as concentrações pré-ovulatórias de estrogênio no fluido folicular estão associadas com altas taxas de desenvolvimento de blastocisto após o cultivo (MERMILLOD et al., 1999). A troca de dominância de estrogênio para progesterona no fluido folicular pré-ovulatório de mamíferos no período entre o pico de LH e a ovulação e a síntese de progesterona pelas células do *cumulus* do COC durante a maturação *in vitro* (MIV), conjuntamente à retomada da meiose e maturação do oócito, sugerem um papel da progesterona na maturação oocitária (SALHAB et al., 2011).

Dependendo se a fase de dominância está associada à presença ou não de progesterona e/ou de um corpo lúteo, o folículo vai se tornar atrésico (folículo dominante não-ovulatório). Isso porque a progesterona presente na fase lútea é um potente supressor da secreção pulsátil de LH por modular os neurônios secretores de GnRH. Ainda que muitos folículos sejam recrutados para iniciar o desenvolvimento, geralmente apenas um chega à fase pré-ovulatória e irá ovular. Com a regressão do folículo dominante não ovulatório ocorre queda nos níveis circulantes de fatores inibitórios do FSH, ocorrendo o reinício de uma nova onda folicular (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Apesar da dinâmica folicular ser semelhante dentro de cada espécie, existem diferenças inter-raciais importantes quanto ao número de ondas durante o ciclo estral, intervalo inter-ovulatório, tempo de apresentação de sinais de estro, intervalo estro/ovulação e número de folículos recrutados por onda. Viana et al. (2000), trabalhando com zebuínos da raça Gir, observaram ciclos com duas (6,67%), três (60,00%), quatro (26,67%) e cinco (6,67%) ondas de crescimento folicular. Já

animais da raça holandesa, em geral, demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GINTHER et al., 1989).

Além do número de ondas, outra diferença observada entre bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* é o diâmetro máximo do folículo dominante, sendo cerca de 11 mm em zebuínos (FIGUEIREDO et al., 1997) e de 16 mm em Holandês (GINTHER et al., 1996). O menor diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo (CL) observado em zebuínos quando comparado com taurinos provavelmente se deve a uma menor capacidade de secreção de LH e a uma menor taxa de crescimento folicular (BÓ et al., 2003).

Em zebuínos da raça Gir, Viana et al. (2000) encontraram, para ciclos com três ou quatro ondas de crescimento, o intervalo inter-ovulatório de $21,11 \pm 1,76$ e $22,25 \pm 1,71$ dias, respectivamente. A duração do estro é mais curta nos zebuínos quando comparado com os animais de raças europeias, havendo também uma maior incidência de estro durante a noite. Existem trabalhos que descrevem que fêmeas *B. taurus indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular do que fêmeas *B. taurus taurus* (MARTINS, 2007).

2.2 A RAÇA GIR NO CONTEXTO DA PECUÁRIA LEITEIRA BRASILEIRA

A genética da raça Gir apresenta-se distribuída em quase todas as regiões do país, presente em mais de 80% dos rebanhos leiteiros nacionais, sendo animais puros ou por meio de cruzamentos com animais holandeses e, portanto, merecem destaque no panorama da pecuária no Brasil (ALVES et al., 2004). Dessa forma, demonstra-se o enorme potencial de mercado desta raça, visto que seus cruzamentos apresentam bom desempenho na produção de leite, rusticidade e maior resistência a endo e ectoparasitas, especialmente em sistemas de pastejos (BORGES et al., 2004).

Originária da região do Kathiawar, na Índia, a raça Gir foi introduzida oficialmente no Brasil após importações ocorridas entre 1906 e 1962. Uma vez em território nacional, teve ampla aceitação por criadores, graças à sua adaptabilidade aos mais diversos sistemas de produção (LEDIC et al., 2009).

O melhoramento genético para leite na raça Gir apresenta duas importantes fases. A primeira caracteriza-se pela seleção praticada em nível de rebanho e a segunda, após a implantação do Programa Nacional de Melhoramento Genético do

Gir. Os importantes trabalhos de seleção praticados pela iniciativa pública e privada demonstraram a viabilidade técnica e econômica e a resposta à seleção para leite na raça Gir criada nas condições brasileiras. Esses trabalhos praticados em rebanhos fechados tiveram resultados favoráveis durante anos, até que os criadores notaram redução nas respostas à seleção, especialmente porque os trabalhos eram executados em rebanhos fechados, com pouca introdução de novas linhagens nos plantéis (REIS FILHO, 2006).

Logo, em 1985 foi instituído o Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir (PNMGGL), visando proceder a avaliação genética das vacas e executar o teste de progênie dos touros. Esse trabalho viria complementar a fase de seleção praticada em cada fazenda e efetuar um teste central com delineamento apropriado, para comparar, numa mesma base de avaliação, os touros de vários rebanhos, identificando aqueles superiores para produção de leite, com base no desempenho das filhas (LEDIC et al., 2009).

2.3 ENDOGAMIA

O pequeno número de animais da raça Gir introduzidos no Brasil, o uso intensivo de um pequeno número de touros provados, e a intensificação da utilização em grande escala de biotecnologias reprodutivas aumentam a probabilidade de co-seleção de indivíduos pertencentes à mesma família e de acasalamentos entre animais aparentados. A soma destes fatores pode ter contribuído para redução da diversidade genética dessa população da raça Gir, resultando em animais endogâmicos (REIS FILHO et al., 2010).

Para exemplificar a redução na diversidade genética na raça Gir, Santana Junior et al. (2014), estudaram a história, estrutura e diversidade genética desta raça. Verificaram que o uso de um número limitado de antepassados tem aumentado anualmente. Segundo estes autores, em 1993, os 10 e 100 antepassados foram responsáveis por 17% e 49% do conjunto de genes da população Gir; em 2010, essas contribuições foram de 44 e 76%, respectivamente.

Da mesma forma, apenas 47 ancestrais foram responsáveis por 50% da diversidade genética do Guzerá leiteiro do Brasil (Peixoto et al., 2010). Na raça holandesa (entre 2000 e 2008) e Jersey (entre 2000 e 2007), os 10 melhores

antepassados contribuíram 62% e 59% do conjunto de genes da população, respectivamente (STACHOWICZ et al., 2011).

Esses resultados mostram que alguns indivíduos têm contribuído amplamente para a formação de determinadas raças. A seleção artificial e uso intensivo de um pequeno número de pais e mães podem levar ao aumento da endogamia e, conseqüentemente, à depressão endogâmica sobre as características de produção e reprodução.

Existem duas causas possíveis do declínio no fenótipo das características quantitativas por endogamia. A primeira é que os genes favoráveis têm tendência a serem dominantes ou parcialmente dominantes; e o segundo é o fato de animais heterozigotos apresentarem um valor fenotípico mais vantajoso que o homozigoto (REIS FILHO et al., 2010).

O coeficiente de endogamia, denotado por F , mede a correlação entre os gametas que se unem para formar um zigoto (WRIGHT, 1923) e equivale à metade do coeficiente de parentesco dos pais, quando o ancestral comum é não endogâmico. Para o cálculo de F , uma população é considerada como base, ou seja, seus ascendentes são desconhecidos (fundadores). Essa população é utilizada como referência para posteriores comparações com a população sob estudo e assume-se que possua coeficiente de endogamia igual a zero.

Os efeitos da endogamia sobre características de importância econômica atraem considerável interesse da pesquisa, já que o incremento do coeficiente de endogamia conseqüente ao processo de seleção parece inevitável. Vários estudos relacionam o aumento da endogamia em *B. taurus indicus* com a redução significativa da característica fenotípica de interesse econômico (QUEIROZ et al., 1993; PANETTO et al., 2010).

As características reprodutivas são teoricamente as mais afetadas pelo efeito da endogamia. Reis Filho (2006) encontraram para a característica da idade ao primeiro parto na raça Gir, acréscimo de 1,66 dias para cada 1% de aumento no coeficiente de endogamia. Em relação ao índice intervalo entre partos, Dias et al. (1994) encontraram aumento de 1,36 dias neste intervalo para cada 1% de aumento na endogamia, em oito rebanhos da raça Nelore analisados.

2.4 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A inseminação artificial foi a primeira biotecnologia adotada no sistema de produção brasileiro e visa à multiplicação genética por meio da utilização de touros de alto valor genético. A introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões, junto com a criopreservação de embriões na década de 80, proporcionou um avanço na bovinocultura, permitindo aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético (LOIOLA, 2014).

No entanto, segundo Bó et al. (2000), alguns inconvenientes podem ser observados nos programas de superovulação, tais como a necessidade de iniciar o tratamento hormonal em momento determinado do ciclo estral e pouca consistência na produção de embriões viáveis pelas doadoras, sobretudo quando se considera que 20% a 30% das doadoras não produzem nenhum embrião transferível.

A variabilidade na produção de embrião pode ser influenciada por fatores relacionados com o tratamento superovulatório ou, em maior grau, por fatores individuais associados às características da dinâmica folicular ovariana ou condição ovariana no momento da superovulação (DIAZ, 2001). Além disso, repetidos tratamentos superovulatórios em novilhas e vacas afetam a fertilidade, podendo causar cistos e dificuldade para o estabelecimento de prenhez posteriormente (GALLI et al., 2003).

A PIVE, assim, é considerada a terceira geração de biotecnologias da reprodução aplicadas ao melhoramento. Esta biotecnologia expandiu-se a partir de 1981, quando nasceu o primeiro bezerro oriundo de fecundação *in vitro* utilizando oócitos maturados *in vivo* e sêmen fresco (THIBIER et al., 1992). A partir de 1986, tornou-se possível a fecundação de oócitos maturados *in vitro* utilizando sêmen congelado (PARRISH et al., 1986). Pieterse et al. (1988) descreveram o método de punção folicular para a recuperação de oócitos a partir de fêmeas vivas. No Brasil, os primeiros produtos de PIVE foram obtidos em 1994 utilizando oócitos imaturos, sêmen descongelado e sistemas de co-cultivo. Portanto, a partir da década de 90, a FIV tornou-se uma biotecnologia bastante promissora para a produção animal, sendo utilizada como ferramenta para o melhoramento genético animal (BOLS et al., 2012).

Dessa forma, a PIVE compreende um conjunto básico de tecnologias de reprodução que envolve a obtenção de oócitos imaturos de folículos ovarianos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (KANE, 2003).

Segundo Gonçalves et al. (2002), a obtenção de oócitos pode ser realizada a partir de punção folicular ou dissecação folicular, em ovários provenientes de abatedouros ou, *in vivo*, por laparotomia/laparoscopia ou ultrassonografia via transvaginal.

A técnica de punção folicular guiada por ultrassonografia foi desenvolvida pela necessidade de um método de recuperação de oócitos que fosse menos traumático que os procedimentos já existentes e que não envolvesse uma abordagem cirúrgica ou semi-cirúrgica dos ovários (VIANA et al., 2003).

O advento da ultrassonografia na reprodução animal marcou a evolução da obtenção de oócitos bovinos *in vivo* (BONI, 2012). Os primeiros relatos ocorreram em 1987, em que os ovários eram manipulados por via transretal e posicionados dorso-lateralmente na cavidade abdominal e um transdutor linear com frequência de 3,5 MHz era posicionado externamente na pele, na região paralombar, de forma que fosse possível a visualização dos folículos e sua punção por meio de agulhas específicas (SENEDA et al., 2002).

Pieterse et al. (1988), a partir de modificações da técnica usada para humanos, descreveram a aspiração folicular via transvaginal por meio da ultrassonografia, tornando viável o aproveitamento de oócitos de forma simples e inócua.

A aspiração a campo é realizada com o auxílio de um transdutor, que é acoplado à guia de aspiração, realizada com uma agulha em sua extremidade e conectada a uma bomba a vácuo que permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular, levando-os direto para um tubo de 50 mL. Esta técnica é considerada pouco traumática, e pode ser utilizada repetidas vezes em um mesmo animal, com eficiência semelhante ou eventualmente até maior que a da laparoscopia. Em seguida, é feita a procura e seleção dos oócitos viáveis em microscópio estereoscópico, de acordo com sua morfologia. Aqueles selecionados são, então, transportados até o laboratório onde se inicia as etapas de produção *in vitro* (GARCIA et al., 2004).

A frequência do transdutor constitui-se em variável importante no processo de recuperação dos oócitos. Há citações de frequências de 3.5 MHz, 7.5 MHz, 5.0 MHz e 6.5 MHz (BUNGARTZ et al., 1995). A maioria dos autores cita a utilização de transdutores convexos ou setoriais para a aspiração folicular transvaginal (BOLS et al., 1996), com poucos relatos de transdutores lineares. O principal aspecto desfavorável da aspiração com o transdutor linear refere-se ao espaço limitado entre o transdutor e a agulha. A restrição de espaço impede que todas as regiões do ovário sejam puncionadas, mesmo modificando-se o posicionamento da gônada. Bols et al. (2004) recomendam o transdutor setorial para procedimentos de OPU de rotina devido a sua maior área de digitalização e capacidade de detectar mais folículos pequenos.

A agulha utilizada tem influência direta nos resultados da OPU. Segundo Fernandes (2002), agulhas longas - específicas para aspiração folicular - apresentam custo elevado, além de perda da eficiência progressiva, o que pode levar a uma má recuperação dos oócitos. Já agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 a 20 Gauge (G) possibilitam uma boa taxa de recuperação, conservando a qualidade dos oócitos.

A pressão de vácuo, assim como a agulha utilizada durante a OPU, também tem uma influência significativa na qualidade morfológica dos oócitos recuperados (BOLS et al., 1996). Estes autores relacionaram que baixas pressões, como 50 mm Hg, foram pouco eficientes para a aspiração, enquanto que pressões maiores como 120 mm Hg danificavam o revestimento do *cumulus* oophorus. Há uma grande variação entre os trabalhos, com valores de 40 a 400 mm Hg, embora isto deva ser considerado com ressalvas, já que todo o sistema pode influenciar na pressão de vácuo final. Logo, é interessante um equilíbrio entre a eficiência da aspiração e a qualidade dos oócitos aspirados (BONI, 2012).

Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos na tentativa de identificar os de maior viabilidade. Na figura 1 apresenta-se uma adaptação da proposição de Lonergan (1992).

Qualidade oocitária	Descrição
Grau I	Células do <i>cumulus</i> compactadas, contendo mais de três camadas de células
Grau II	Células do <i>cumulus</i> compactadas parcialmente presentes em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares.
Grau III	Células do <i>cumulus</i> com apenas uma camada de células
Sem <i>cumulus</i>	Ausência de camada de células do <i>cumulus</i>
Expandido	Células do <i>cumulus</i> expandidas
Atrésico	Células do <i>cumulus</i> em regressão celular
Degenerado	Oócitos com sinais de degeneração

Figura 1. Quadro com a classificação oocitária de acordo com a composição do *cumulus oophorus*. Adaptado de Ferraz, 2008.

Para Gonçalves et al., 2002, o oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário observado pela células do *cumulus* oócito (COC). Morfologicamente, os oócitos que possuem maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granações finas de coloração marrom e completamente envolvidas por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta.

Durante a maturação, a primeira etapa laboratorial da produção *in vitro*, os oócitos colhidos passam por uma série de transformações do núcleo e do citoplasma. A maturação nuclear *in vivo* inicia após o pico pré-ovulatório de LH, enquanto que *in vitro* esse processo é iniciado logo após a remoção do oócito do ambiente folicular, quando é retomada a meiose. Se o oócito não completou a transformação citoplasmática final no início da maturação espontânea, pode ter prejudicado a capacidade de desenvolvimento embrionário (GORDON, 2003).

Em geral, os oócitos adquirem progressivamente competência para o desenvolvimento durante o crescimento folicular, embora haja capacidade de desenvolvimento igual de oócitos coletados de folículos pequenos ou grandes (FENG et al., 2007). Não observa-se diferença nas taxas de blastocisto entre oócitos coletados de 3-5 mm em comparação com os folículos de 6-8 mm. No entanto,

oócitos coletados de folículos dominantes (> 13 mm) produzem uma taxa de blastocistos significativamente mais elevada do que os oócitos obtidos de folículos de 3-8 mm (MERTON 2003).

Assim, a atresia precoce observada em oócitos provenientes de folículos maiores mostra ter um efeito positivo sobre a competência oocitária (BLONDIN e SIRARD, 1995). Isso pode ser parcialmente explicado pela semelhança nas mudanças ultra-estruturais observada em oócitos submetidos à pré-maturação e naqueles que entram em atresia precoce (ASSEY et al., 1994).

Com o objetivo de adiar o recomeço da meiose *in vitro*, pesquisadores como Albuz et al. (2010) descreveram o adiamento da retomada da meiose e um aumento significativo na taxa de produção de embriões. Estes autores desenvolveram um protocolo de MIV que inclui tanto um período de pré-MIV e um período prolongado de MIV.

Durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro*, as células somáticas (da granulosa e do *cumulus oophorus*) interagem com os oócitos através das junções *gap*, facilitando a passagem de nutrientes e proteínas reguladoras que participam do crescimento e maturação destes (MIYANO, 2003). Para que todos os eventos de maturação oocitária ocorram *in vitro* é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo*.

Os meios utilizados para a maturação *in vitro* são modificados de acordo com a rotina de cada laboratório e, geralmente, utiliza-se como base o Tissue Culture Medium (TCM-199, Mediatech, Washington, DC, Estados Unidos). Este meio base pode ser modificado, adicionando-se piruvato, lactato, aminoácidos, bicarbonato de sódio, vitaminas, antibióticos (GONÇALVES et al., 2008) e, ainda, fontes proteicas de origem animal, tais como soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA). A adição de alguns hormônios ao meio, como LH, FSH ou, ainda, a associação de ambas as gonadotrofinas com hormônios esteróides, tem sido utilizada a fim de maximizar a porcentagem de oócitos que completam a meiose e para aumentar a capacidade de fecundação e desenvolvimento até o estágio de blastocistos (ALVES et al., 2001).

Com poucas exceções, a maturação de oócitos bovinos *in vitro* é realizada a 39°C por 22 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada

(GONÇALVES et al., 2002). Somente após a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática, o oócito torna-se competente para a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (MINGOTI, 2005).

A fertilização é caracterizada pela fusão do espermatozóide com o oócito. Posteriormente, ocorre a exocitose dos grânulos corticais e a retomada da meiose com extrusão do segundo corpúsculo polar e formação do pronúcleo feminino. O núcleo espermático se descondensa transformando-se no pronúcleo masculino. Os pronúcleos masculino e feminino migram para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem, iniciando o desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2002).

Para a fertilização *in vitro*, antes da capacitação e após o descongelamento da palheta de sêmen, os espermatozoides viáveis precisam ser separados do plasma seminal, dos crioprotetores, dos extensores e das células mortas (GONÇALVES et al., 2008). Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de Percoll e o *swim-up* (GALLI e LAZZARI, 1996). Na prática, geralmente é utilizada a concentração de 1×10^6 a 2×10^6 espermatozóides/mL, calculada de acordo com a motilidade e a população viva de espermatozóides obtida após o processo de separação (GONÇALVES et al., 2002). Neste caso, a capacitação espermática é geralmente promovida pela heparina, um glicosaminoglicano presente em altas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (BLONDIN et al., 2009)

O co-cultivo de espermatozóides e oócitos para a FIV geralmente é realizado por um período de aproximadamente 6 a 9 horas ou 18 a 22 horas, a 39°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada em meio Fert-TALP (PARRISH et al., 1986).

Mesmo com o sistema de fertilização *in vitro* apresentando condições muito similares às *in vivo*, ainda são obtidos resultados variados com espermatozóides oriundos de touros ou partidas diferentes. Bavister (2002) estima que, em média, 40% dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até o estágio de blastocisto.

O cultivo embrionário *in vitro* corresponde ao desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. É durante este período que ocorrem eventos como: ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos

blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocle (GARCIA et al., 2004). Esses eventos podem ser afetados por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como composição da atmosfera gasosa, aminoácidos, pH, fatores de crescimento, luminosidade e vitaminas (CAMARGO et al., 2006).

As condições de cultivo *in vitro* são de fundamental importância para a obtenção de bons índices de produção (GARCIA et al., 2004). Segundo Camargo et al. (2006), os meios podem ser classificados em indefinido, semidefinido ou definido, de acordo com suas formulações e condições. Os diversos nutrientes utilizados nos diferentes meios não conseguem suprir totalmente as necessidades embrionárias, ainda sendo observadas alterações moleculares e fenotípicas nos embriões (FARIN et al., 2006).

Entre os principais meios de cultivo embrionário disponíveis no mercado estão o SOF (fluido sintético do oviduto), o KSOM, o CR1aa e o CR2aa. O uso de meios sequenciais também vem sendo utilizado devido às variações nas exigências nutricionais dos embriões durante o seu crescimento. Estes são modificados durante o cultivo, de forma a simular as condições encontradas nos diferentes locais do trato reprodutivo durante o período de pre-implantação embrionária (CAMARGO et al., 2006).

O cultivo embrionário *in vitro* varia de 7 a 9 dias a 39°C, em atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia após a fecundação, quando poderão ser transferidos para o útero de receptoras previamente sincronizadas, que poderão levar a gestação a termo.

O método de aspiração *in vivo* associado à FIV é de grande importância para gerar um número muito maior de descendentes de doadoras de alto valor genético quando comparada com outras biotecnologias como a inseminação e superovulação, produzir embriões de vacas gestantes, para vacas que não respondem à superovulação, para animais portadores de patologias reprodutivas adquiridas e não transmissíveis, e para animais senis e pré-púberes (BONI, 2012). Os oócitos podem ser coletados em períodos menores entre uma aspiração e outra, sem causar transtornos no ciclo estral ou para a prenhez.

Outra vantagem particular da PIVE é a maximização do uso do sêmen, permitindo maior produção de embriões com doses de alto valor comercial e, inclusive, sêmen sexado (FABER et al., 2003). A produção de embriões *in vitro* tem contribuído para uma maior difusão do uso de sêmen sexado (PONTES et al., 2010). Além desses aspectos, a PIVE também é uma excelente ferramenta para a pesquisa de fenômenos relativos aos processos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos durante a maturação, fertilização, cultivo *in vitro*, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES et al., 2008).

Entre as limitações desta técnica está o custo elevado, a inconsistência dos resultados referentes à taxa blastocistos e menores taxas de prenhez, se comparado com a MOET (MIRANDA et al., 2007). Uma das grandes questões abordadas quando se utiliza a aspiração folicular são os efeitos colaterais. Uma preocupação observada em estudos nos quais doadoras foram submetidas a repetidas aspirações foi que, a partir da quinta sessão, se tornou cada vez mais difícil obter uma boa anestesia peridural, mesmo alternando o espaço intervertebral utilizado para infiltração anestésica. A diminuição da qualidade do bloqueio anestésico pode contribuir negativamente para a taxa de recuperação de oócitos em animais aspirados duas vezes por semana (VIANA et al., 2004).

Apesar dos avanços obtidos e de já estar sendo rotineiramente realizada, os índices da PIVE tem permanecido estáveis. Estudos relataram taxas de recuperação de COCs cerca de 70% por meio da aspiração folicular transvaginal em animais não estimulados (VIANA et al., 2004), taxa de maturação nuclear e fecundação em torno de 80% e a de blastocisto entre 35-45%, sendo que somente cerca de 40% destes embriões são capazes de gerar uma prenhez após a transferência dos embriões à fresco e elevada incidência de abortos e natimortos (PONTES et al., 2011). Assim, evidencia-se que ainda há a necessidade de melhorar a qualidade biológica e a criopreservação dos embriões.

Há fortes evidências de que diversos fatores exercem influência considerável sobre a produção dos oócitos (MERTON, 2009) e a qualidade (CALEGARI et al., 2006), tais como a idade da doadora, a alimentação, a estação do ano, variações individuais entre as doadoras, raça das doadoras, fase do ciclo estral, novilhas púberes e não púberes, equipe de punção e o material utilizado, intervalo entre as

aspirações, tratamentos hormonais como aplicação de BST (Somatotropina Recombinante Bovina) e FSH, quantidade de células do *cumulus*, as quais possuem participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos, melhorando resultados e promovendo melhores desenvolvimentos embrionários (MERTON, 2009). No entanto, poucos estudos no que diz respeito à influência da endogamia - particularmente da raça Gir - foram realizados abordando a quantidade e/ou qualidade dos oócitos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUZ, F. K., SASSEVILLE, M., LANE, M., ARMSTRONG, D. T., THOMPSON, J. G., GILCHRIST, R.B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): A novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction** 25(12): 2999-3011, 2010.

ALVES, D. D., PAULINO, M. F., BACKES, A. A., VALADARES FILHO, S. C., RENNÓ, L. N. Características de carcaça de bovinos zebu e cruzados holandês-zebu (F1) nas fase de recria e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia** 33: 1274-1284, 2004.

ALVES, J. D. R., OLIVEIRA, M. A. L., LIMA, P. F., CALDAS, J. G. L., SANTOS FILHO, A. S., BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH na maturação *in vitro* de oócitos *Bos Indicus*. **Ciência Rural** 31 (4): 645-649, 2001.

ASSEY, R. J., HYTTEL, P., GREVE, T., PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development** 37:335-344, 1994.

BAVISTER, B. D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction** 124: 181-196, 2002.

BLONDIN, P., BEAULIEU, M., FOUNIER, V., MORIN, N., CRAWFORD, L., MADAN, P., KING, W. A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology** 71: 30-38, 2009.

BLONDIN, P., SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 41: 54-62, 1995.

BÓ, G. A., ADAMS, G. P., MAPLETOFT, R. J. Dinâmica Folicular Ovariana en el Bovino. In: Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, 2000, São Paulo: Departamento de reprodução animal: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Anais**, p.12–34, 2000.

BÓ, G. A., BARUSELLI, P. S., MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** 78: 307–326, 2003.

BOLS, P. E. J., LEROY, J. L. M. R., VANHOLDER, T., VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology** 62: 906–914, 2004.

BOLS, P. E. J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M. T., VANDENHEEDE, J. M. M., DE KRUIF, A. Effects of Aspiration Vacuum and Needle Diameter on Cumulus Oocyte Complex Morphology and Developmental Capacity of Bovine Oocytes. **Theriogenology** 45: 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E., JORSSEN, E. P., GOOVAERTS, I. G., LANGBEEN, A., LEROY, J. L. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction** 9 (3): 420-25, 2012.

BONI, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. **Animal Reproduction** 9 (3): 362-369, 2012.

BORGES A. M., TORRES C. A. A., JÚNIOR V. R. R., RUAS J. R. M., CARVALHO G. R. Desenvolvimento Folicular no Pós-Parto de Vacas da Raça Gir Tratadas com Acetato de Buserelina (GnRH) ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). **Revista Brasileira de Zootecnia** 33 (6): 1396-1404, 2004.

BUNGARTZ, L., LUCAS-HAHN, A., RATH, D., NIEMANN, H. Collection of Oocytes From Cattle Via Follicular Aspiration Aided by Ultrasound With or Without Gonadotropin Pretreatment and In Different Reproductive Stages. **Theriogenology** 43: 667-675, 1995.

BURATINI JR., J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos, **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31 (2): 190-196, 2007.

CAIXETA, E. S., RIPAMONTEC, P., FRANCO, M. M., BURATINI J., DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in *cumulus* cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development** 21: 655–664, 2009.

CALEGARI, R. S., PACHOAL, D. M., MARTINS JR, A.. Aspição folicular em vacas Nelore: efeitos da idade da doadora e época do ano sobre a produção e qualidade dos oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae** 34: 477, 2006.

CAMARGO, L. S. A., VIANA, J. H. M., SÁ, W. F., FERREIRA, A. M., RAMOS, A. A., VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction** 3: 19-28, 2006.

CAMPBELL, B. K., SCARAMUZZI, R. J., WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility** 49: 35-350, 1995.

DIAS, A. S. C., QUEIROZ, S. A., ALBUQUERQUE, L. G. Efeito da endogamia em características reprodutivas de bovinos da raça Caracu. **Revista Brasileira de Zootecnia** 23: 157-164, 1994.

DIAZ, T. Effects of the Persistent Dominant Follicle on the Ability of Follicle Stimulating Hormone to Induce Follicle Development and Ovulatory Responses. **Journal of Dairy Science** 84 (1): 88-99, 2001.

DUNN, M H., MAYO, K. Gonadotropin Signaling in the Ovary In Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**. v.1, 3a ed. USA, Elsevier Inc. cap14 p.547-592, 2006.

EVANS, A. C. O., ADAMS, G. P., RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 wk of age. **Journal of Reproduction and Fertility** 102: 463-470, 1994.

FABER, D. C., MOLINA, J. A., OHLRICH, C. L., VANDER WAAG, D. F., FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology** 59: 125- 138, 2003.

FAIR, T., HULSHOF, S. C. J., HYTTEL, P., BOLAND, M., GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anatomy and Embryology** 195: 327-336, 1997.

FARIN, P. W., PIEDRAHITA, J. A., FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology** 65: 178-191, 2006.

FENG, W. G., SUI, H. S., HAN, Z. B., CHANG, Z. L., ZHOU, P., LIU, D. J., BAO, S., TAN, J. H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-indrop culture system. **Theriogenology** 67: 1339-50, 2007.

FERNANDES, C. B. **Aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som em bovinos e eqüinos**. Monografia (Seminários I do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

FERRAZ, M. L. **Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

FIGUEIREDO, R. A., BARROS, C. M., PINHEIRO, O. L., SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology** 47: 1489-1505, 1997.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology** 59: 599-616, 2003.

GALLI, C., LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Journal of Reproduction Science** 42: 371-379, 1996.

GARCIA, J. M., AVELINO, K. B., VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2004. p. 223-230.

GEARY, D. C., HOARD, M. K., NUGENT, L. Independent contributions of the central executive, intelligence, and in-class attentive behavior to developmental change in the strategies used to solve addition problems. **Journal of Experimental Child Psychology** 113: 49-65, 2012.

GINTHER, O. J., BEG, M. A., BERGFELT, D. R., KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction** 124: 475–482, 2002.

GINTHER, O. J., KNOPF, L., KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility** 8: 223-230, 1989.

GINTHER, O. J., KOT, K., KULICK, L. J., WILTBANK, M. C. Emergence and Deviation of Follicles During the Development of Follicular Waves in Cattle. **Theriogenology** 48: 75–87, 1997.

GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C., FRICKE, P. M., GIBBONS, J. R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology Reproduction** 55: 1187-94, 1996.

GONÇALVES, P. B. D., BARRETA, M. H., SIQUEIRA, L. C., ANTONIAZZI, A. Q. Biotecnologias da reprodução animal Produção *in vitro* de embriões. **Ciências Veterinárias nos Trópicos** 11: 135-138, 2008.

GONÇALVES, P. B. D., VISINTIN, J. A., OLIVEIRA, M. A. L., MONTAGNER, M. M., COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 195-226.

GORDON, I. R. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. ed. London: CABI, 2003.

HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. Cromossomos X e Y: espermatozoides transportadores. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed., São Paulo: Manole, 2004. p. 395-398.

.

KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology, **Animal Reproduction Science** 79: 171– 190, 2003.

LEDIC, I. L., REIS FILHO, J. C., VERCESI FILHO, A. E., VERNEQUE, R.S. Avaliações Genéticas. Diferenças nas PTAs entre diferentes estimativas. **Revista GirGirGir** 9 (9): 110-116, 2009.

LOIOLA, M. V. G., CHALHOUB, M., RODRIGUES, A. S., FERRAZ, P. A., BITTENCOURT, R. F., RIBEIRO FILHO, A. D. L. Validation of a program production *in vitro* embryo cattle with transport of oocytes and embryo for long distance. **Ciência Animal Brasileira** 15 (1): 93-101, 2014.

LONERGAN, P. **Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**.1992. 157f. Tese (PhD). National University of Ireland.

LONERGAN, P., FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, 69 (1), 17-22, 2008.

LUSSIER, J. G., MATTON, P., DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility** 81: 301-307, 1987.

MARTINS, C. M. **Diferentes protocolos de superovulação com inseminação Artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2007. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MERMILLOD, P., OUSSAID, B., COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility** 54: 449-60, 1999.

MERTON, J. S., ASK, B., ONKUNDI, D. C., MULLAART, E., COLENBRANDER, B., NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up—*in vitro* production embryo-production program. **Theriogenology** 72: 885–893, 2009.

MERTON, J. S., DE ROOS, A. P. W., MULLAART, E., DE RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P. L. A. M., DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry, **Theriogenology** 59: 651-674, 2003

MINGOTI, GZ. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução**, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.

MIRANDA, M. S., CARVALHO, C. M. F., CORDEIRO, M. S., SANTOS, S. S. D., OHASHI, O. M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31: 218-223, 2007.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology** 59: 61-72, 2003.

PANETTO, J. C. C., GUTIÉRREZ, J. P., FERRAZ, J. B. S., CUNHA, D. G., GOLDEN, B. L. Assessment of inbreeding depression in a Guzerat dairy herd: effects of individual increase in inbreeding coefficients on production and reproduction. **Journal of Dairy Science** 93: 4902-4912, 2010.

PARRISH J. J., SUSKO-PARRISH, J. L., LEIBFRIEDGE-RUTHEDGE, M. L., CRITSER, E. S., EYESTONE, W. H., FIRST, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology** 25: 591-600, 1986.

PEIXOTO, M. G. C. D., POGGIAN, C. F., VERNEQUE, R. S., EGITO, A. A., CARVALHO, M. R. S, PENNA, V. M., BERGMANN, J. A. G., VICCINI, L. F., MACHADO, M. A. Genetic basis and inbreeding in the Brazilian Guzerat (*Bos*

indicus) subpopulation selected for milk production. **Livestock Science** 131: 168-174, 2010.

PIETERSE, M. C., KAPPEN, K. A., KRUIP, T. A. M., TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology** 30: 751-762, 1988.

PONTES, J. H. F., SILVA, K. C. F., BASSO, A. C., RIGO, A. G., FERREIRA, C. R., SANTOS, G. M. G., SANCHES, B. V., PORCINATO, J. P. F., VIEIRA, P. H. S., FAIFER, F. S., STERZA, F. A. M., SCHENK, J. L., SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicustaurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology** 74: 1349-1355, 2010.

PONTES, J. H. F., STERZA, F. A. M., BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES, B. V., RUBIN, K. C. P., SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology** 75: 1640-1646, 2011.

QUEIROZ, S. A., LÔBO, R. N., MARTINEZ, M. L. Efeito da endogamia sobre algumas características de importância econômica na raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia** 22: 773-786, 1993.

RAJKOVIC, A., PANJAS, S. A., MATZUK, M. M. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models In Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**. Vol 1, 3a ed. USA, Elsevier Inc. cap 10, p.383-422, 2006.

REIS FILHO, J.C. **Endogamia na Raça Gir**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

REIS FILHO, J. C., LOPES, P. S., VERNEQUE, R. S., TORRES, R. A., TEODORO, R. L., CARNEIRO, P. L. S. Population structure of Brazilian Gir dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 2640-2645, 2010.

SALHAB, M., TOSCA, L., CABAU, C., PAPILLIER, P., PERREAU, C., DUPONT, J., MERMILLOD, P., UZBEKOVA, S. Kinetics of gene expression and signaling in bovine *cumulus* cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, *cumulus* apoptosis and P4 secretion. **Theriogenology** 75: 90-104, 2011.

SANTANA JR., M. L., PEREIRA, R. J., BIGNARDI, A. B., EL FARO, L., TONHATI, H., ALBUQUERQUE, L. G. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. **Livestock Science** 163: 26-33, 2014.

SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., ANDRADE, E. R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias** 23 (1): 101-110, 2002.

SILVA-SANTOS, K. C., SANTOS, G. M., SILOTO, L. S., HERTEL, M. F., ANDRADE, E. R., RUBIN, M. I., STURION, L., MELO-STERZA, F. A., SENEDA, M. M. Estimate

of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology** 76: 1051-1057, 2011.

STACHOWICZ, K., SARGOLZAEI, M., MIGLIOR, F., SCHENKEL, F.S. Rates of inbreeding and genetic diversity in Canadian Holstein and Jersey cattle. **Journal of Dairy Science** 94: 5160-5175, 2011.

THIBIER, C.; DENOULET, P.; JESSUS, C.; OZON, R. A predominant basic alpha-tubulin isoform present in prophase *Xenopus* oocyte decreases during meiotic maturation. *Biology of the Cell*, v.75 (3), p.173-180, 1992.

VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., FERNANDES, C. A. C., MARQUES JÚNIOR, A. P. 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** 84: 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M., FERREIRA, A. M., DE SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A. Follicular Dynamics in Zebu Cattle **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35 (12): 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H. M., NASCIMENTO, A. A., PINHEIRO, N. L., FERREIRA, A. M., CAMARGO, L. S. A., SÁ, W. F., MARQUES Jr, A. P. Caracterização de sequelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 23 (3): 119-124, 2003.

WRIGHT, S. Mendelian analysis of the pure breeds of livestock. I. The measurement of inbreeding and relationship. **Journal of Heredity** 14: 339-348, 1923.

YEO, C., GILCHRIST, R. B., LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during *in vitro* maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction** 80: 1072-1080, 2009.

CAPÍTULO 1
EFEITO DA EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA
PROBABILIDADE DE PREENHEZ

RESUMO

A melhoria nos sistemas de cultivo *in vitro* para otimizar a produção de embriões tem sido um dos principais objetivos de pesquisas em biotecnologia da reprodução. A relação entre a eficiência dos sistemas de produção de embriões e os resultados de prenhez, no entanto, permanecem controversos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro* derivados de lotes de doadoras da raça Gir com diferentes índices de eficiência relativa. Foram avaliados dados de 702 sessões de punção folicular e produção *in vitro* de embriões (PIVE) e de 2.456 transferências de embriões, realizadas entre os anos 2008 a 2012. Todas as doadoras eram do mesmo rebanho e da raça Gir (*Bos indicus*), assim como utilizou-se sêmen para fertilização *in vitro* de indivíduos da mesma raça. A recuperação de COC (complexo *cumulus*-oócito) e a PIVE foram realizadas pela mesma equipe, em um único laboratório de fertilização *in vitro* e utilizando o meio e os procedimentos padrão. Apenas os dados a partir de embriões transferidos a fresco foram utilizados e os registros de 97 sessões de OPU/PIVE em que nenhum embrião foi produzido, ou embriões foram congelados ou descartados devido à falta de destinatários, foram excluídos. As 605 sessões restantes foram estratificadas em quartis (I a IV, cada uma correspondendo a 25% do total de dados) de acordo com a produção de COC das doadoras, ou estratificadas em faixas (0-25%, 26-50%, 51-75% e 76-100%), de acordo com a qualidade do COC (em porcentagem do COC viável ou de COC grau I) e de pontos de eficiência de produção de embriões (taxa de clivagem, taxa de blastocistos). As taxas de prenhez foram comparadas entre quartis ou faixas pelo teste do qui-quadrado. Em média, as doadoras da raça Gir produziram $24,8 \pm 0,6$ COC por OPU, da qual $14,4 \pm 0,4$ foram classificados como viáveis (57,8%), e $3,2 \pm 0,1$ em grau I (12,9%). Em média, $6,1 \pm 0,2$ embriões (mórulas e blastocistos) foram produzidos por OPU por doadora, e a taxa de prenhez foi de 30,9%. Como esperado, as doadoras com maior rendimento de COC total (quartil I), também produziram mais oócitos viáveis ($25,5 \pm 0,7$ vs $15,7 \pm 0,3$, $10,5 \pm 0,2$ e $5,8 \pm 0,2$), mais oócitos de grau I ($4,8 \pm 0,4$ vs $3,9 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,2$ e $1,6 \pm 0,1$) e mais embriões ($9,0 \pm 0,4$ vs $6,9 \pm 0,3$, $5,0 \pm 0,2$ e $3,3 \pm 0,1$) do que as doadoras dos quartis II, III ou IV, respectivamente ($P < 0,0001$). No entanto, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de prenhez de embriões produzidos a partir de

doadores classificados nos diferentes quartis (30,9% vs 29,3%, 31,5% e 30,5% para os quartis I a IV, respectivamente). Da mesma forma, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de gestação de embriões oriundos de sessões de OPU em que houve um percentual alto ou baixo de COCs viáveis ou grau I. Na eficiência da produção *in vitro* (taxas de clivagem e de blastocisto) também não teve efeito ($P > 0,05$) sobre novas taxas de prenhez. Em conclusão, estes resultados sugerem que não há nenhuma relação entre o número médio ou a qualidade do COC recuperado por OPU, a eficiência de PIVE e a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Aspiração folicular, Índices de eficiência, Gir, Oócitos, Taxa de gestação.

ABSTRACT

Improving *in vitro* culture systems to optimize embryo yield has been a major research goal in reproduction biotechnology. The relationship between the efficiency of embryo production systems and the pregnancy outcomes, however, remain controversial. The aim of the present study was to evaluate the likelihood of pregnancy of *in vitro* produced embryos derived from batches with different relative efficiency indexes. Data of 702 ovum pick-up (OPU) and *in vitro* embryo production (IVEP) sessions, and of 2,456 embryo transfers, recorded from 2008 to 2012, were evaluated. All donors were from the same herd, and were of the same breed (Gir, *Bos indicus*), as well as the semen used for IVF. The COC recovery and IVEP were performed by the same team, in a single IVF laboratory, and using standard medium and procedures. Only data from embryos transferred as fresh were used, and records from 97 OPU/IVEP sessions in which no embryo was produced, or embryos were frozen or discharged due to lack of recipients, were discharged. The remaining 605 sessions were stratified in quartiles (I to IV, each one corresponding to 25% of total data) according to COC production of the donors, or stratified in ranges (0-25%, 26-50%, 51-75%, and 76-100%) according to COC quality (percentage of viable COC or of grade I COC) and to embryo production efficiency endpoints (cleavage rate, blastocyst rate). Pregnancy rates were compared among quartiles or ranges by the chi-squared method. On average, the Gir donors produced 24.8 ± 0.6 COC per OPU, from which 14.4 ± 0.4 were classified as viable (57.8%), and 3.2 ± 0.1 as grade I (12.9%). On average 6.1 ± 0.2 embryos (morulas and blastocysts) were produced per OPU per donor, and mean pregnancy rate was 30.9%. As expected, donors with greater total COC yield (quartile I) also produced more viable oocytes (25.5 ± 0.7 vs 15.7 ± 0.3 , 10.5 ± 0.2 and 5.8 ± 0.2), more COC grade I (4.8 ± 0.4 vs 3.9 ± 0.3 , 2.6 ± 0.2 and 1.6 ± 0.1), and more embryos (9.0 ± 0.4 vs 6.9 ± 0.3 , 5.0 ± 0.2 and 3.3 ± 0.1) than donors from quartiles II, III or IV, respectively ($P < 0.0001$). Nevertheless, there was no difference ($P > 0.05$) in pregnancy rates for embryos produced from donors ranked in the different quartiles (30.9% vs 29.3%, 31.5% and 30.5% for quartiles I to IV, respectively). Similarly, there was no difference ($P > 0.05$) in the pregnancy rate of embryos derived from OPU sessions in which there was a high or low percentage of viable or grade I COCs. *In vitro* production efficiency (cleavage and blastocyst rates)

also had no effect ($P>0.05$) on further pregnancy rates. In conclusion, these results suggest that there is no relationship among the average number or quality of the COC recovered by OPU, the efficiency of IVEP, and the likelihood of pregnancy of *in vitro* derived embryos.

Keywords: Efficiency rates, Follicular aspiration, Gir, Oocyte, Pregnancy rate.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica que permite aumentar o número de descendentes de doadoras de alto valor genético. Segundo Gonçalves et al. (2007), cada fêmea bovina é capaz de produzir de 50 a 100 embriões/ano, apesar de existir uma grande variação deste número entre doadoras. Isso permite uma diminuição do intervalo de gerações, acelerando o melhoramento genético animal (VARAGO et al., 2008).

No entanto, a produção de embriões, seja *in vivo* ou *in vitro*, ainda é caracterizada pela inconstância nos resultados. Essa instabilidade ocorre devido aos efeitos de variáveis intrínsecas ao processo (SIRARD et al., 2006), dificultando a otimização do método.

Considerando-se os baixos índices de geração de blastocisto e de gestações obtidas, a PIVE é caracterizada por uma baixa eficiência relativa (CAMARGO et al., 2006). Além disso, situações como bezerros com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumentos na incidência de abortos, de mortalidade perinatal e de anormalidades congênitas têm sido associadas às prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (VAN WAGTENDONK DE LEEW et al., 2000).

Já foram relatadas taxas de recuperação de complexo *cumulus*-oócito (COC) de cerca de 70% em animais não estimulados por meio da aspiração folicular transvaginal (VIANA et al., 2004). Além disso, foi descrita taxa de maturação nuclear e fecundação em torno de 80% e a taxa de blastocisto entre 35-45% dos oócitos fertilizados (BOLS et al., 2012), sendo que somente cerca de 40% destes embriões são capazes de gerar uma prenhez após a transferência (PONTES et al., 2011).

Geralmente, os valores médios de produção de embriões são utilizados para coordenar as etapas de um programa de transferência de embriões (TE) e PIVE. Diante desse cenário, evidencia-se a necessidade de melhorar as etapas da PIVE, destacando-se os sistemas de cultivo *in vitro* para otimizar a produção dos embriões e, conseqüentemente, aumentar a eficiência do processo.

Devido à relação entre a eficiência dos sistemas de produção *in vitro* de embriões e os resultados de prenhez, permanecerem controversos, tornam-se necessárias pesquisas que esclareçam a associação entre esses fatores. Dessa

forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro* derivados de lotes de doadoras com diferentes índices de eficiência relativa.

2. OBJETIVOS

Avaliar se a taxa de prenhez é influenciada pelos seguintes índices: número de oócitos recuperados, taxa de oócitos viáveis, taxa de oócitos de grau I, taxa de clivagem e taxa de blastocisto.

3. HIPÓTESE

Maiores índices de eficiência relativa na PIVE interferem na taxa de gestação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO

As aspirações foliculares foram realizadas na Fazenda do Basa, localizada no município de Leopoldina, Minas Gerais (225m de altitude, 21°31'55" latitude sul e 42°38'35" de longitude oeste) no período de maio de 2008 a fevereiro de 2012.

A topografia da região caracteriza-se por superfícies onduladas a montanhosas. O clima local, segundo a classificação de Köppen (1948), é o Aw, que corresponde a clima tropical úmido, com inverno seco, verão chuvoso e temperatura média do mês mais frio superior a 18°C.

As doadoras foram mantidas em piquetes rotacionados de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*) cv. Africana, com água e sal mineral *ad libitum* e suplementação à base de ração com 22% de proteína, silagem de milho e feno.

O controle sanitário dos animais era realizado com vacinações contra IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), BVD (Diarreia Viral Bovina), Leptospirose,

Carbúnculo, Raiva, Aftosa, além de um esquema estratégico no controle de ecto e endoparasitas.

4.2 DOADORAS

Foram utilizadas 90 doadoras de oócitos da raça Gir (*Bos indicus*), de diferentes famílias com idade entre 15 e 158 meses. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação e foram submetidos ao mesmo manejo nutricional e sanitário durante o experimento.

4.3 PUNÇÃO FOLICULAR (OPU) E RECUPERAÇÃO DE COC'S

Foram realizadas aspirações foliculares com a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom (OPU - *Ovum Pick Up*) nas doadoras pelos técnicos de uma empresa brasileira especializada na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Os procedimentos foram realizados utilizando-se equipamento de ultrassom Mindray DP 2200 (Mindray, Shenzhen, China) com transdutor microconvexo de 6,5 MHz conectado a guia de punção WTA (WTA[®], Cravinhos, SP, Brasil) com cateteres 18G (JELCO[®] PLUS, Medex do Brasil, SP, Brasil) e linha de aspiração (WTA[®], Cravinhos, SP, Brasil) em tubos falcon de 50 ml (Corning[®] Glass Works., Corning, NY, Estados Unidos). A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de aspiração (BV003d WTA[®], Cravinhos, SP, Brasil) ajustada entre 72 e 82 mm Hg.

Para evitar movimentos abruptos, desconforto e movimentos peristálticos que poderiam causar lesões nos animais, foi realizada anestesia epidural, utilizando-se 3 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor (Anestésico L, Pearson, São Paulo, Brasil). Para evitar contaminações, realizou-se assepsia da região do ânus e vulva dos animais e em seguida foi realizada a manipulação transretal, para que os ovários fossem posicionados para facilitar a punção dos oócitos. Posteriormente, o transdutor acoplado à guia de biópsia e agulha foi introduzido pelo canal da vagina e os folículos com diâmetro igual e superior a 3 mm a serem aspirados foram posicionados no percurso da agulha e apresentados na tela do ultrassom. Com o auxílio da bomba de vácuo, os folículos foram aspirados e o mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário. No final de cada procedimento, o sistema que liga a agulha à bomba de vácuo foi lavada com meio

de manutenção composto de DPBS (DulbeCOC Mod. PBS, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) acrescido de 5,0 UI/ml de heparina sódica (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) para um tubo de 50 ml contendo o material aspirado.

Em seguida, os tubos contendo o material aspirado foram conduzidos ao laboratório da fazenda, onde foram transferidos ao filtro de colheita de embriões (EmCom[®], Nutricell, Campinas, Brasil) e lavados três vezes com a mesma solução utilizada na aspiração para uma placa de Petri. Em seguida, foi realizada a seleção, contagem e classificação dos oócitos por meio de um estereoscópio, os quais foram classificados de acordo com o número e disposição das células do *cumulus* e aparência do citoplasma em oócitos com *cumulus* (grau I, grau II ou grau III), sem *cumulus*, expandido, atresícos ou degenerados, segundo Lonergan (1992).

Os oócitos considerados viáveis (grau I, II e III) foram lavados em solução de TCM-199 Hepes (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA), suplementada com 10% de SFB, 50 µg de gentamicina e 2,2 µg de piruvato. Após essa etapa, os oócitos foram acondicionados em criotubos (Uniscience, São Paulo, Brasil) com 400 µL de meio de maturação constituído de TCM-199 bicarbonato (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA), suplementado com 10% de SFB, 50 UI de hCG/mL; 0,5 µg/mL de FSH; 1 µg/mL de estradiol; 2,2 µg/mL de piruvato e 70 µg/mL de amicacina. Esse meio foi recoberto por 300 µL de óleo mineral. Por fim, gaseificou-se o ambiente interno do criotubo com uma mistura de 5% de CO₂ e submeteu-se os mesmos ao transporte em incubadora portátil (19180/0002, Minitube, Tiefenbach, Alemanha) a uma temperatura de 38,5°C.

4.4 PRODUÇÃO *IN VITRO* DOS EMBRIÕES

Chegando ao laboratório, os oócitos em maturação foram transferidos para placas de *Petri* (100x20mm-TPP, Vitrocell, Campinas, Brasil), em microgotas de 100 µL de meio de maturação semelhante ao usado no transporte. Os oócitos permaneceram incubados por 24 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Percorrido o tempo de maturação, os oócitos foram lavados três vezes em meio de fecundação TALP-FIV e transferidos para microgotas de 100 µL de meio de fecundação Tyrode modificado (TALP) suplementado com 10 µg/mL de heparina e 160 µL de solução de epinefrina (PHE). Foi utilizado sêmen criopreservado de 12 touros da raça Gir. O sêmen foi separado em gradiente de Percoll 90 e 45%,

submetido a uma força de centrifugação de 200 g durante 30 minutos. O segmento recuperado foi avaliado e ajustado de modo a obter a concentração final de 100×10^3 espermatozoides viáveis por gota. Posteriormente, foram incubados por 18 horas a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar para a fecundação.

Após o tempo de fecundação, as estruturas foram lavadas por três vezes e transferidas para microgotas de 100 µL de meio de cultivo SOF modificado recobertas com óleo mineral. O meio de cultivo foi renovado em cada microgota no terceiro e no quinto dia (*feeding*), permanecendo nestas por um período de seis dias, até serem submetidos ao transporte para a propriedade onde estavam as receptoras.

4.5 RECEPTORAS DE EMBRIÕES E TRANSFERÊNCIAS DE EMBRIÕES

Foram utilizadas receptoras (vacas e novilhas) mestiças do mesmo rebanho, as quais foram submetidas ao protocolo de transferência de embriões em tempo fixo. As receptoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Cronipres® 0,558g P4, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina) associado a 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Bioestrogen®, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina). No dia 8, os dispositivos foram retirados e foram aplicados 300 UI de gonadotrofina coriônica equina i.m. (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), 150 µg de cloprostenol i.m. (Croniben®, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina) e 1 mg de cipionato de estradiol i.m. (ECP®, Zoetis, Guarulhos, Brasil). Os embriões foram transferidos 17 dias após o início do protocolo. Anteriormente a cada inovulação, os mesmos procedimentos referentes à limpeza, assepsia e anestesia realizados nas doadoras foram conferidos às receptoras. Também foram realizadas palpação retal para determinação da presença do corpo lúteo (CL) e, posteriormente, transferências dos embriões no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente. A transferência dos embriões foi realizada por técnicos especializados, pelo método transcervical (não cirúrgico).

4.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal, 30 dias após a data da FIV e repetido com 60 dias, utilizando transdutor linear de 5,0 MHz (Aloka SSD 500, Aloka, Japão). Foi considerado diagnóstico de gestação

positivo a presença de uma vesícula embrionária com viabilidade confirmada (batimento cardíaco).

4.7 DESENHO EXPERIMENTAL

Foi realizada a análise retrospectiva dos dados de 702 sessões de aspiração folicular e PIVE e de 2.456 transferências de embriões, realizadas entre maio de 2008 e fevereiro de 2012. Todas as doadoras eram do mesmo rebanho e da mesma raça (Gir, *Bos indicus*). O sêmen utilizado para fertilização *in vitro* também era de indivíduos da raça Gir. A recuperação de COC e PIVE foram realizadas pela mesma equipe, em um único laboratório de fertilização *in vitro*, e utilizando o meio e os procedimentos padrão. Apenas os dados a partir de embriões transferidos a fresco foram utilizados. Registros de 97 sessões de OPU/PIVE em que nenhum embrião foi produzido, ou embriões foram congelados ou descartados devido à falta de destinatários, foram excluídos.

As 605 sessões restantes foram estratificados em quartis (I a IV, cada uma correspondendo a 25% do total de dados) de acordo com a produção de COC das doadoras. Os dados também foram estratificados em faixas (0-25%, 26-50%, 51-75% e 76-100%), de acordo com a qualidade do COC (em percentagem do COC viável ou de COC grau I) e também de pontos de eficiência de produção de embriões (taxa de clivagem, taxa de blastocistos).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de recuperação de oócitos foram submetidos à análise estatística descritiva. As médias seguidas de desvio padrão número de COC's recuperados, taxa de oócitos viáveis, taxa de oócitos grau I, taxa de clivagem e taxa de blastocistos foram obtidas e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. Esse procedimento foi realizado para demonstrar as diferenças entre os quartis determinados. Os dados referentes a essas comparações encontram-se no anexo. As taxas de gestação das receptoras inovuladas foram comparadas entre quartis ou faixas pelo método do qui quadrado.

De acordo com os índices de eficiência relativa na produção *in vitro* de embriões, as doadoras foram distribuídas em diferentes quartis ou faixas. O objetivo

foi separar as doadoras em classes para facilitar as comparações entre elas, haja vista a grande variação individual.

Em relação ao rendimento de COC total, as doadoras foram distribuídas em quartis. Nesse caso, no primeiro quartil foram agrupadas as doadoras que obtiveram de 112 a 32 oócitos totais, enquanto que no segundo e terceiro quartis agruparam-se aquelas que obtiveram recuperação oocitária de 31 a 22 e 14 a 21 oócitos totais, respectivamente. Finalmente, no quarto quartil, aquelas que obtiveram de 1 a 13 oócitos totais.

Quanto à porcentagem de oócitos viáveis em relação ao número total de oócitos recuperados por OPU, as doadoras que produziram de 100 a 67% de oócitos viáveis foram classificadas na primeira faixa. As segunda e terceira faixas corresponderam às taxas de 66 a 59% e 58 a 50%, respectivamente, e a quarta faixa, às doadoras que produziram de 49 a 15% de oócitos viáveis.

Da mesma forma, as doadoras foram distribuídas de acordo com a porcentagem de oócitos grau I em relação ao número de oócitos viáveis recuperados por OPU. Assim, as faixas foram estratificadas e classificadas com as seguintes porcentagens: 100 a 80%, 75 a 52,4%, 25,9 a 50% e 0 a 25%.

Já na eficiência da produção *in vitro* em relação à taxa de clivagem, as doadoras também foram distribuídas em faixas percentuais, que foram: 75,68 a 100%, 51,72 a 75% e 22,50 a 50%. De modo semelhante, a taxa de blastocistos em relação ao número de embriões clivados foram estratificados em faixas de 76,47 a 100%, 52 a 75%, 25,81 a 50% e 2,38 a 25%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 605 sessões realizadas, foram recuperados 14.633 oócitos. Deste total, 6.180 (42%) foram classificados como oócitos inviáveis e 8.453 (58%) como oócitos viáveis, dentre os quais 1.887 foram classificados em grau I, 2.598 em grau II e 3.968 em grau III (Figura 1).

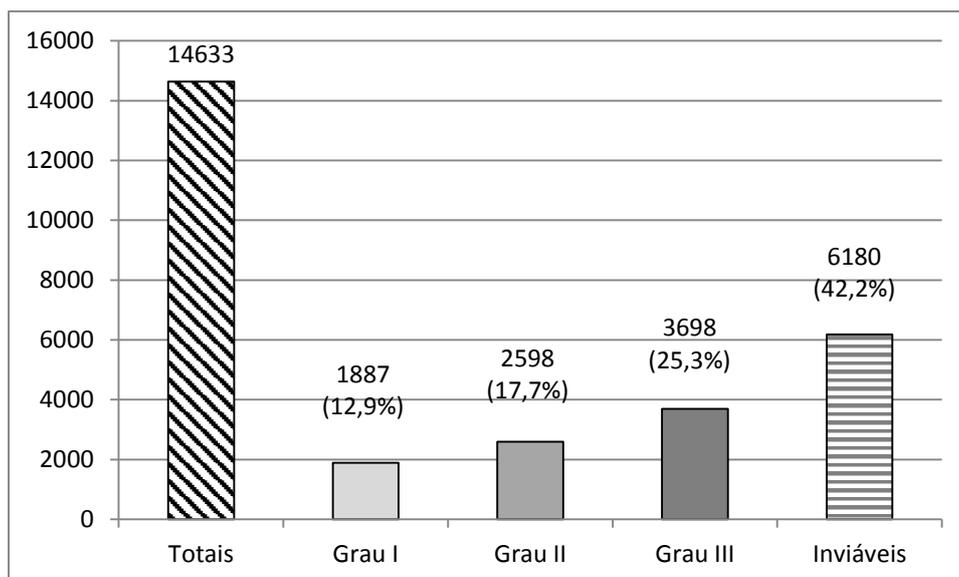


Figura 1. Número de oócitos inviáveis e viáveis (classificados em grau I, II ou III) produzidos por meio da OPU.

Em média, as doadoras da raça Gir produziram $24,8 \pm 0,6$ COC por OPU, na qual $14,4 \pm 0,4$ (57,8%) foram classificados como viáveis e $3,2 \pm 0,1$ (12,9%) em grau I (Tabela 1).

Tabela 1. Número total, média e erro padrão do número de oócitos viáveis (GI, GII e GIII) e inviáveis recuperados em 605 sessões de aspiração folicular em doadoras da raça Gir.

	Total	Média \pm EP (CV)
COC	14633	$24,8 \pm 0,6$ (60,1)
Oócitos Viáveis	8453	$14,4 \pm 0,4$ (61,1)
GI	1887	$3,2 \pm 0,1$ (103,1)
GII	2598	$4,4 \pm 0,1$ (81,8)
GIII	3968	$6,7 \pm 0,2$ (91,1)
Oócitos Inviáveis'	6180	$10,5 \pm 0,3$ (68,6)

COC: Total de complexo *cumulus*-oócitos; GI: Oócitos viáveis grau I; GII: Oócitos viáveis grau II; GIII: Oócitos viáveis grau III; EP: Erro padrão; CV: Coeficiente de variação.

Os resultados médios de recuperação de estruturas totais e oócitos viáveis por sessão de aspiração ($24,8 \pm 0,6$ e $14,4 \pm 0,4$; respectivamente) foram superiores aos previamente relatados por Pontes et al. (2010) ($17,1 \pm 4,5$ e $12,1 \pm 3,9$), para a raça Gir. Também foram superiores aos obtidos por Viana et al. (2012), que analisaram os dados de quatro consolidadas empresas brasileiras produtoras de

embriões bovinos *in vitro* e encontraram média de 19,90 oócitos por OPU, variando entre 15,20 e 24,40.

A disponibilidade de oócitos é considerada um dos principais fatores que influenciam a produção de embriões *in vitro*. Essa característica apresenta grande variabilidade individual e depende de diversas variáveis fisiológicas ou patológicas, como idade, padrão nutricional, estação do ano, temperatura e fatores genéticos (MEIRELLES et al., 2008). Estas variáveis podem justificar o coeficiente de variação alto encontrado neste estudo.

A forma como cada procedimento de aspiração folicular é realizado pela equipe técnica também influencia na recuperação oocitária. A quantidade de punções, o tipo de bomba de vácuo, a pressão utilizada, o tipo de agulha, a eficiência do técnico e modificações na classificação dos oócitos são fatores extrínsecos que podem justificar as divergências entre os autores (VIANA e BOLS, 2005; SENEDA et al., 2006; PONTES et al., 2009).

O número de estruturas classificadas como “não-viáveis” por sessão ($10,5 \pm 0,3$) foram semelhantes ao observado em aspirações realizadas aleatoriamente em relação ao ciclo estral (MANIK et al., 2003). Entretanto, foram superiores aos resultados obtidos por Oliveira (2011), de $5,0 \pm 5,6$, que trabalhou com doadoras da raça Gir submetidas a protocolos hormonais de pré-aspiração. Esse método tem como objetivo sincronizar a onda de crescimento folicular das doadoras, evitando a presença de folículos dominantes, os quais podem promover efeito deletério sobre a qualidade oocitária dos demais folículos (HENDRIKSEN et al., 2004). Esse resultado está de acordo com aqueles demonstrados por autores que descreveram uma melhor qualidade oocitária com a sincronização da onda e redução do efeito da dominância (MELO, 2008). Isso poderia explicar a elevada recuperação de oócitos inviáveis por sessão de OPU neste experimento, já que não foi realizado nenhum protocolo de sincronização da onda folicular nos animais deste estudo.

Outra questão a ser considerada está relacionada aos danos mecânicos inerentes aos sistemas de aspiração folicular utilizados para a recuperação de oócitos. O efeito da pressão de vácuo e da configuração do sistema sobre a integridade do complexo *cumulus*-oócito foi bem caracterizado (VIANA e BOLS, 2005), e resulta principalmente em forças de “*shear stress*” e atrito que acarretam a

perda de células do *cumulus* dos oócitos, resultando na formação de oócitos desnudos, contribuindo também com a produção de oócitos inviáveis.

Foram produzidos 3.669 embriões (mórulas e blastocistos), o que corresponde a uma média de $6,1 \pm 0,2$ por OPU por doadora. Em alguns momentos, a quantidade de embriões produzidos superou a quantidade de receptoras disponíveis para transferência. Dessa forma, em determinadas situações ao longo do experimento, parte dos embriões produzidos foram congelados e até mesmo descartados. Assim, foram computados 2.456 embriões transferidos, que resultaram em 760 gestações (30,9%) (Tabela 2).

Tabela 2. Número total, média e erro padrão de oócitos recuperados, oócitos maturados, embriões clivados, embriões produzidos, embriões transferidos e gestações obtidas referentes a 605 sessões de OPU em doadoras da raça Gir.

	COC	MIV	CLIV	Embriões	TE	P+
Total	14633	9018	7593	3669	2456	760
Média±EP	24,8±0,6	14,9±0,4	12,6±0,3	6,1±0,2	4,1±0,1	1,3±0,1
(CV)	(60,1)	(63,1)	(64,3)	(63,9)	(70,7)	(107,7)
Porcentagem (%)	100	62	52	25	17	5

COC: Total de complexo *cumulus*-oócitos recuperados; MIV: Oócitos maturados *in vitro*; CLIV: Número de embriões clivados; Embriões: Número de embriões produzidos; TE: Total de embriões transferidos; P+: Número de prenhez obtidas. EP: Erro padrão; CV: Coeficiente de variação.

A produção de embriões encontrada neste estudo, que corresponde a uma taxa de 25% em relação ao total de oócitos recuperados, são relativamente superiores aos valores obtidos por Pontes et al. (2010), de 3,2 embriões/OPU por doadora da raça Gir. Entretanto, este resultado é relativamente inferior se comparado com um estudo realizado por Pontes et al. (2009) na raça Nelore, em que obtiveram média de $9,4 \pm 5,3$. O número médio de embriões obtidos por bateria, contudo, é característico de raças zebuínas, e relativamente superior ao normalmente obtido com raças taurinas (SENEDA, 2005). Thibier (2004) encontraram média de 1,6 embriões por sessão de aspiração em doadoras da raça Holandesa, evidenciando a grande diferença entre as raças.

Diferenças na produção de embriões podem também ser explicadas pelo fato de que sistemas de cultivo *in vitro* são processos elaborados, nos quais variações na composição dos meios ou nas condições de cultivo podem influenciar a produção de

embriões. Outro ponto limitante da produção de embriões *in vitro* é a característica inicial dos oócitos cultivados (SIRARD, 2006).

As taxas de gestação encontradas neste estudo foram relativamente inferiores às citadas por Pontes et al. (2010), que observaram taxa de gestação de 40% trabalhando com doadoras da raça Gir. Essas taxas também foram relativamente inferiores às obtidas por Viana et al. (2010), que verificaram taxa de gestação de 38,5%. Em contrapartida, existem vários relatos sobre taxas de prenhez de receptoras bovinas em embriões produzidos *in vitro* variando de 30 a 51% (HASLER, 2000; SCHMIDT, 2007; ANDRADE et al., 2012), as quais são inferiores às aquelas obtidas com os produzidos *in vivo* (HASLER, 2003). Segundo Hasler (2003), as diferenças bioquímicas e metabólicas nos embriões podem afetar os resultados das taxas de prenhez. Shulman et al. (1993) destacaram a grande importância da boa qualidade do embrião para a obtenção de bons resultados, já que existe uma relação positiva entre a qualidade morfológica dos embriões e a posterior taxa de prenhez.

Outro fator que pode influenciar a probabilidade de prenhez é a sincronia embrião-receptora, sendo um dos mais importantes na seleção das receptoras para um programa de PIVE de embriões (ANDRADE et al., 2012). Peixoto et al. (2004) descreveram melhores taxas de prenhez em receptoras que deram cio um dia antes da aspiração folicular. Segundo Callesen et al. (1996), isto poderia ocorrer devido ao estabelecimento precoce das condições uterinas ideais. A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária, sendo a progesterona importante por controlar mudanças no útero, além de influenciar o crescimento embrionário (REIS FILHO, 2006). Por outro lado, Spell et al. (2001) não encontraram efeito de sincronismo na taxa de prenhez.

A condição nutricional também é um fator que pode comprometer a taxa de prenhez de receptoras. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com baixo desempenho reprodutivo e redução nas taxas de concepção em vacas de corte e de leite (SANTOS, 2005). Na literatura científica, vários estudos associaram a nutrição à redução da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causas determinantes o balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela diminuição do escore da condição corporal no pós-parto (MOREIRA et al., 2000).

Conforme esperado e mostrado na tabela 3, as doadoras com maior rendimento de COC total (quartil I), também produziram mais oócitos viáveis ($25,5\pm 0,7$ vs $15,7\pm 0,3$, $10,5\pm 0,2$ e $5,8\pm 0,2$), mais oócitos de grau I ($4,8\pm 0,4$ vs $3,9\pm 0,3$, $2,6\pm 0,2$ e $1,6\pm 0,1$), e mais embriões ($9,0\pm 0,4$ vs $6,9\pm 0,3$, $5,0\pm 0,2$ e $3,3\pm 0,1$) do que as doadoras dos quartis II, III ou IV, respectivamente ($P < 0,0001$).

Tabela 3. Número total, média e erro padrão de oócitos recuperados (COC), oócitos viáveis, porcentagem de oócitos viáveis em relação ao número total de oócitos recuperados, oócitos de grau I, porcentagem de oócitos grau I em relação ao número de oócitos viáveis, embriões produzidos e porcentagem de embriões produzidos em relação ao número de oócitos maturados subdivididos entre os quartis.

	Quartil I	Quartil II	Quartil III	Quartil IV
COC	$44,8\pm 1,1^a$ (29,9)	$27,0\pm 0,2^b$ (10,4)	$18,0\pm 0,2^c$ (12,8)	$9,6\pm 0,3^d$ (33,3)
Oócitos viáveis	$25,5\pm 0,7^a$ (34,1)	$15,7\pm 0,3^b$ (19,8)	$10,5\pm 0,2^c$ (21,9)	$5,8\pm 0,2^d$ (40,4)
Oócitos viáveis (%)	$56,9\pm 0,8$ (17,9)	$58,3\pm 0,8$ (17,2)	$58,5\pm 0,9$ (19,7)	$61,2\pm 1,4$ (28,5)
Oócitos GI	$4,8\pm 0,4^a$ (91,7)	$3,9\pm 0,3^b$ (84,6)	$2,6\pm 0,2^c$ (84,6)	$1,6\pm 0,1^d$ (93,8)
Oócitos GI (%)	$19\pm 1,3$ (82,6)	$24,1\pm 1,6$ (79,7)	$24,6\pm 1,6$ (76,8)	$28,7\pm 2,2$ (94,5)
Embriões	$9\pm 0,4^a$ (54,4)	$6,9\pm 0,3^b$ (50,7)	$5,0\pm 0,2^c$ (46,0)	$3,3\pm 0,1^d$ (48,5)
Embriões (%)	36,8 (50,0)	43,5 (48,1)	48,5 (44,5)	62,2 (42,0)
Taxa de gestação (%)	$30,9^a$ (280/905)	$29,3^a$ (186/635)	$31,5^a$ (152/483)	$30,4^a$ (152/483)

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($P < 0,0001$) pelo Teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui-Quadrado ($P > 0,05$). COC: Total de complexo *cumulus*-oócitos recuperados; Oócitos viáveis (%): porcentagem de oócitos viáveis; GI: oócitos grau I; Oócitos GI (%): porcentagem de oócitos grau I; % embriões: porcentagem de embriões.

Os dados da tabela 3 mostram que doadoras que produzem menor número de oócitos - supostamente as piores doadoras considerando-se a produção absoluta

- convertem mais embriões proporcionalmente. Não há uma explicação aparente para o fato, considerando-se que a expectativa seria o oposto devido ao efeito aditivo dos COCs em cultivo (BRUM, 2004). Esses resultados sugerem que o número de oócitos recuperados por OPU não está diretamente relacionado com o potencial de desenvolvimento do oócito.

Não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de prenhez de embriões produzidos a partir de doadores classificados nos diferentes quartis (30,9% vs 29,3%, 31,5% e 30,5% para os quartis I a IV, respectivamente-Tabela 3).

Os resultados apresentados na tabela 3 estão de acordo com Oliveira (2011), que trabalhou com a variação do potencial de doadoras da raça Gir para a produção *in vitro* de embriões. Esses autores observaram que as doadoras com maior produção de oócitos produziram mais oócitos viáveis e mais embriões. Entretanto, a taxa de gestação dos embriões produzidos pelas doadoras dos diferentes quartis não diferiram, semelhante aos dados deste estudo.

A taxa de gestação de embriões oriundos de sessões de OPU em que houve um percentual alto ou baixo de COCs viáveis (Tabela 4) ou grau I (Tabela 5) não apresentou diferença ($P > 0,05$).

Tabela 4. Classificação de doadoras estratificadas em faixas de acordo com a porcentagem de oócitos viáveis em relação ao número totais de oócitos recuperados por sessão de OPU e comparação da taxa de prenhez.

Classificação das doadoras	TE	P+	P-	P+ (%)
76-100%	135	34	101	25,2 ^a
51-75%	1767	557	1210	31,5 ^a
0-50%	489	139	350	28,4 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui-Quadrado ($P > 0,05$). TE: Número de embriões transferidos; P+: Número de prenhez obtidas; P-: Prenhez negativa; P+ (%): Porcentagem de prenhez obtidas em relação ao número de transferência de embriões realizadas.

Tabela 5. Classificação de doadoras estratificada em faixas de acordo com a porcentagem de oócitos de grau I em relação ao número de oócitos viáveis recuperados por sessão de OPU e comparação da taxa de prenhez.

Classificação das doadoras	TE	P+	P-	P+ (%)
76-100%	25	11	14	44,0 ^a
51-75%	186	51	135	27,4 ^a
26-50%	745	220	525	29,5 ^a
0-25%	1435	448	987	31,2 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui-Quadrado ($P > 0,05$). TE: Número de embriões transferidos; P+ Número de prenhez obtidas; P-: Prenhez negativa; P+ (%): Porcentagem de prenhez obtidas em relação ao número de transferência de embriões realizadas.

Independente da taxa de oócitos viáveis e da taxa de oócitos grau I, o tamanho do folículo que origina o oócito é um parâmetro importante que pode influenciar a competência deste e, conseqüentemente, pode influenciar na taxa de gestação. Diversos autores observaram que o tamanho do folículo menor que 3 mm de diâmetro está relacionado à menor competência oocitária (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN e SIRARD, 1995). Quando os oócitos são recuperados muito precocemente, provavelmente estes não possuem alguns fatores foliculares adicionais para aquisição da competência. Muitos dos oócitos recuperados para serem utilizados na PIVE têm um potencial reduzido de desenvolvimento por serem retirados precocemente do ambiente folicular e não estarem totalmente competentes ou prontos para serem fecundados (JEE et al., 2009). Por outro lado, oócitos oriundos de folículos grandes estão relacionados à maior competência, conseqüentemente maiores taxas de clivagem são obtidas (CAIXETA et al., 2009).

Assim, observa-se que, apesar de altas ou baixas taxas de oócitos de grau I ou oócitos viáveis, não há alteração significativa da taxa de prenhez. Na tabela 5, observa-se que as doadoras classificadas na faixa de 76-100% de oócitos viáveis apresentaram uma elevada taxa de prenhez se comparada com as outras faixas, que pode ser justificada pelo número menor de embriões transferidos dessas doadoras.

Portanto estes resultados podem ser explicados pelo fato dos critérios de avaliação morfológica oocitária não estarem correlacionados com a competência do oócito que depende da diferenciação do folículo que o originou (BLONDIN et al.,

2012). É importante ressaltar que os danos mecânicos inerentes ao sistema de aspiração folicular podem comprometer a qualidade do oócito.

Na eficiência da produção *in vitro*, em relação às taxas de clivagem (Tabela 6) e as taxas de blastocistos (Tabela 7), também não houve efeito ($P>0,05$) sobre as taxas de prenhez.

Tabela 6. Classificação de doadoras com estratificação de acordo com a taxa de clivagem em relação ao número de oócitos maturados no laboratório e comparação da taxa de prenhez.

Classificação das doadoras	TE	P+	P-	P+ (%)
76-100%	1908	589	1319	30,9 ^a
51-75%	459	141	318	30,7 ^a
0-50%	89	30	59	33,7 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui-Quadrado ($P>0,05$). TE: Número de embriões transferidos; P+: Número de prenhez obtidas; P-: Prenhez negativa; P+ (%): Porcentagem de prenhez obtidas em relação ao número de transferência de embriões realizadas.

Tabela 7. Classificação de doadoras estratificadas em faixas de acordo com a taxa de blastocistos em relação ao número de embriões clivados no laboratório e comparação da taxa de prenhez.

Classificação das doadoras	TE	P+	P-	P+ (%)
76-100%	348	97	251	27,9 ^a
51-75%	770	266	504	34,5 ^a
26-50%	1091	326	765	29,9 ^a
0-25%	247	71	176	28,7 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui-Quadrado ($P>0,05$). TE: Número de embriões transferidos; P+: Número de prenhez obtidas; P-: Prenhez negativa; P+ (%): Porcentagem de prenhez obtidas em relação ao número de transferência de embriões realizadas.

A capacidade de clivagem é um potencial intrínseco dos oócitos cultivados de grandes mamíferos, pois podem ocorrer em ausência de fertilização por um simples estímulo de ativação (corrente elétrica, etanol) (WARE et al., 1989). Portanto, as variações na taxa de clivagem estão relacionadas com o perfil folicular a partir do qual o oócito é obtido, sendo que oócitos originados de folículos diferenciados têm uma maior capacidade para a clivagem. Sendo assim, independentemente de taxas de clivagens altas ou baixas, o que determina a

clivagem de um determinado oócito é seu potencial intrínseco (BLONDIN et al., 2012).

As taxas de blastocistos altas ou baixas não interferem na porcentagem de gestação. Como são transferidos embriões já na fase de blastocisto, estes já passaram da fase de transição materno zigótico, o que significa que os oócitos que originaram os embriões transferidos tem qualidade suficiente para gerar uma gestação, independente dos índices de eficiência (BARNES e FIRST, 1991). A ativação da transcrição do genoma embrionário é necessária para o posterior desenvolvimento do embrião. Essa ativação pode depender da ativação ou tradução de alguns fatores de transcrição maternos já armazenados em oócitos competentes, que possibilitam o desenvolvimento do embrião gerando uma gestação (VIGNEAULT et al., 2004). Portanto, a competência para alcançar o estágio de blastocisto está mais relacionada com a avaliação da normalidade da origem do oócito do que outro aspecto (SIRARD et al., 2006).

Além disso, em nenhuma das tentativas de melhorar as condições de cultura para oócitos bovinos houve taxas de produção de blastocistos superiores a 35-45%. Somente com protocolos hormonais pré-aspiração tiveram um efeito significativo no aumento dessas taxas (BLONDIN et al., 2002). Isto sugere que a competência para o desenvolvimento é adquirida principalmente durante o crescimento do oócito dentro do folículo por um mecanismo desconhecido (SIRARD, 2001).

Portanto sugere-se que a taxa de embriões não é determinante, mas a característica inicial do oócito é o principal limitante para a produção de embriões (SIRARD et al., 2006). Quando os oócitos são originários a partir de folículos diferenciados, eles têm uma maior capacidade para produzir um blastocisto saudável, que é normalmente associada a maiores taxas de prenhez.

Os resultados do presente trabalho demonstram que produção de oócitos em quantidade e qualidade e a produção de embriões são características distintas, e sugerem que a associação positiva entre população folicular e fertilidade, conforme demonstrado na raça holandesa (IRELAND, 2008; IRELAND, 2009) pode não ser verdadeira ou ocorrer da mesma forma em raças zebuínas, especialmente na raça Gir.

Um desafio na produção *in vitro* de embriões permanece na recuperação de oócitos competentes. Essa característica é um processo complexo que traduz a

capacidade para completar a maturação, ter sucesso na fertilização, atingir o estágio de blastocisto e produzir uma descendência viável e saudável após a transferência do embrião (BLONDIN et al., 2012).

A hipótese de que quando as etapas da produção *in vitro* de embriões tivessem maiores índices de eficiência, resultariam em maiores taxas de prenhez não foi confirmada. Pois observou-se que os índices de eficiência relativa na PIVE não estão diretamente relacionados com as taxas de gestações obtidas.

6. CONCLUSÃO

Não foi observada diferença na taxa de gestação de embriões provenientes de animais classificados com diferentes índices de produção de COCs, porcentagem de COC viáveis, porcentagem de oócitos grau I, taxas de clivagens e taxas de blastocistos.

Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que diferentes índices de eficiência relativa e taxa de prenhez são características distintas. Maiores índices de eficiência estão relacionados com a recuperação de oócitos competentes, dependendo do ambiente folicular em que são retirados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G. A., FERNANDES, M. A., KNYCHALA, R. M., PEREIRA JUNIOR, M. V., OLIVEIRA, A. J., NUNES, D. P., BONATO, G. L., SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 36 (1): 66-69, 2012.

BARNES, F.L., FIRST, N.L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development** 29: 117-123, 1991.

BLONDIN, P., BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., BARNES, F., SIRARD, M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction** 66: 38-43, 2002.

BLONDIN, P., SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 41: 54-62, 1995.

BLONDIN, P., VIGNEAULT, C., NIVET, A. L., SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? **Animal Reproduction** 9 (3): 281-289, 2012.

BOLS, P. E., JORSSSEN, E. P., GOOVAERTS, I. G., LANGBEEN, A., LEROY, J. L. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction** 9 (3): 420-25, 2012.

BRUM, D. S., LEIVAS, F. G., NOEBAUER, M. R., BERNARDI, M. L., SILVA, C. A. M., RUBIN, M. I. B. Volume de meio e número de oócitos para feundação na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Archives of Veterinary Science** 9 (2): 61-66, 2004.

CAIXETA, E. S., RIPAMONTEC, P., FRANCO, M. M., BURATINI J., DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in *cumulus* cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development** 21: 655–664, 2009.

CALLESEN, H., LIBORIUSSEN, T., GREVE T. Pratical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science** 42: 205-214, 1996.

CAMARGO, L. S. A., VIANA, J. H. M., SÁ, W. F., FERREIRA, A. M., RAMOS, A. A., VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction** 3: 19-28, 2006.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31(2): 212-217, 2007.

HASLER 2000

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

HENDRIKSEN, P. J. M., STEENWEG, HARKEMA, J. C., MERTON, J. S., BEVERS, M. M., VOS, P. L. A. M., DIELEMAN, S. J. Efect of different stage of follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology** 61: 909-920, 2004.

IRELAND, J. J., ZIELAK-STECIWKO, A. E., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J., BETTEGOWDA, A., SCHEETZ, D., WALSH, S., MOSSA, F., KNIGHT, P. G., SMITH G. W., LONERGAN, P., EVANS, A. C. O. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. **Biology of Reproduction** 80: 954–964, 2009.

IRELAND, J. L., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., THEMME, A. P., WARD, F., LONERGAN, P., SMITH, G. W., PEREZ, G. I., EVANS, A. C., IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and

follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction** 79 (6): 1219-25, 2008.

JEE, B., CHEN, H.Y., CHENG, R., CHIAN, R.C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility** 91: 2037-2042, 2009.

KOEPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la Tierra**. Ciudad de México:Fondo de Cultura Economica, 1948. 466p.

LONERGAN, P. **Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**.1992. 157f. Tese (PhD). National University of Ireland.

LONERGAN, P., MONAGHAN, P. RIZOS, D., BOLAND, M. P., GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development** 37: 48-53, 1994.

MANIK, R. S., SINGLA, S. K., PALTA, P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in na Indian breed of cattle. **Animal reproduction Science** 76: 155-161, 2003.

MEIRELLES, F. V., MERIGUE, G. K. F., SANTOS-BIASE, K., BIASE, F. H., PICADA, I. E., PIMENTEL, J. R. V., PERECIN, F., MIRANDA, M. S., DEBEM, T. C., BRESSAN, F., SANGALLI, J. R., PROVIDELO, F. D. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2008. p. 195-205.

MELO, D.S. **Produção *in vitro* de embriões derivados de oócitos obtidos de diferentes fases da onda folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*)**. 88f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu SP, 2008.

MOREIRA, F., RISCO, C., PIRES, M. F. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology** 53: 1305-1319, 2000.

OLIVEIRA, E. R. **Variação do potencial de doadoras da raça Gir para produção *In vitro* de embriões**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). 2011. Universidade José Rosário Vellano, Faculdade de Medicina Veterinária, Alfenas, MG.

PEIXOTO, M. G. C. D., BERGMANN, J. A. G., ALVIM, M. T. T., PENNA, V. M. Fatores quem influenciaram a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5., 2004, Pirassununga, **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004.

PONTES, J. H. F., NONATO JUNIOR, I., SANCHES, B. V., ERENO JUNIOR, J. C., UVO, S., BARREIROS, T. R. R., OLIVEIRA, J. A., HASLER, J. F., SENEDA, M. M.

Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology** 71 (4): 690-697, 2009.

PONTES, J. H. F., SILVA, K. C. F., BASSO, A. C., RIGO, A. G., FERREIRA, C. R., SANTOS, G. M. G., SANCHES, B. V., PORCINATO, J. P. F., VIEIRA, P. H. S., FAIFER, F. S., STERZA, F. A. M., SCHENK, J. L., SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicustaurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology** 74: 1349-1355, 2010.

PONTES, J. H. F., STERZA, F. A. M., BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES, B. V., RUBIN, K. C. P., SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology** 75: 1640-1646, 2011.

REIS FILHO, J.C. **Endogamia na Raça Gir**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SANTOS, R. M. **Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio**. 2005, 78f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

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

SENEDA, M. M., BLASCHI, W., RUBIN, K. C. P, LISBOA, L. A. Aspiração folicular *in vivo*: metodologias, eficiência e sequelas. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais: Palestras.

SENEDA, M. M., SANTOS, G. M. G., SILVA, K. C. F., SPEGIORIN, M. R., BLASCHI, W., PONTES, J. H. F. Situação Atual da Aspiração Folicular e da Fecundação *In vitro*. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. In: 20º simposio internacional de Reproducao Animal Aplicada. **Anais...** Londrina- PR, 2006.

SHULMAN, A., BEN-NUN, I., GHETLER, Y., KANETI, H., SHILON, M., BEYTH, Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after *in vitro* fertilization treatment in conception cycles. **Fertility and Sterility** 60: 123- 126, 1993.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology** 55:1241–1254, 2001.

SIRARD, M. A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology** 65: 126-136, 2006.

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v.56, p.287-97, 2001.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**: 12-19, 2004.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M., MULLART, E., DE ROOS, A. P. W., MERTON, J. S., DEN DASS, J. H. G. DE RUIGH, L. Effect of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology** 53: 575-597, 2000.

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** 32 (2): 100-109, 2008.

VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., FERNANDES, C. A. C., MARQUES JÚNIOR, A. P. 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** 84: 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M., PALHAO, M. P., SIQUEIRA, L. G. B., FONSECA, J. F., CAMARGO L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gir breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology** 73 (7): 966-972, 2010.

VIANA, J.H.M, BOLS, P.E.J. Biologic variables associated with Cumulus oocyte Complex recovery using follicular aspiration. **Acta Scientiae Veterinariae** 33 (1): 1-4, 2005.

VIANA, J.H.M., SIQUEIRA, L. G. B., PALHAO, M. P., CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction** 9 (1): 12-18, 2012.

VIGNEAULT, C., MCGRAW, S., MASSICOTTE, L., SIRARD, M. A. Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of Reproduction** 70: 1701–1709, 2004.

WARE, C. B., BARNES, F.L., MAIKI-LAURILA, M., FIRST, N.L. Age dependence of bovine oocyte activation. **Gamete Research** 22: 265–275, 1989

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA ENDOGAMIA NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM UM REBANHO DA RAÇA GIR

RESUMO

A produção e a qualidade de oócitos recuperados por meio da aspiração folicular são influenciados por fatores como o coeficiente de endogamia. O objetivo deste estudo foi estimar parâmetros genéticos e avaliar os efeitos da endogamia sobre a quantidade e qualidade de oócitos obtidos de doadoras da raça Gir por meio de aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Um modelo animal unicaracterístico foi utilizado para estimar parâmetros genéticos e soluções para coeficiente de endogamia para o rendimento de oócitos recuperados. As aspirações de oócitos foram realizadas em 153 doadoras de diferentes famílias da raça, do mesmo rebanho, de maio de 2008 a abril de 2014. Foram avaliados dados de 1045 sessões de (OPU) e os oócitos obtidos foram contados, analisados morfológicamente e classificados em sete categorias: com *cumullus* (grau I, grau II ou grau III), sem *cumullus*, expandidose atrésicos ou degenerados, de acordo com o número e disposição das células do *cumullus* e aparência do citoplasma. Foram realizados testes para identificar o modelo com melhor ajuste, que resultou na escolha do modelo que utiliza o efeito do coeficiente de endogamia linear e quadrático como covariável. O coeficiente de endogamia médio calculado no rebanho estudado foi 0,69%. Observou-se o que o aumento do coeficiente de endogamia levou à diminuição do número de oócitos totais e viáveis e o aumento do número de oócitos inviáveis. As estimativas de herdabilidade variaram entre 0,30 e 0,56 para a quantidade e qualidade de oócitos, respectivamente. Esses resultados sugerem que é possível alcançar o progresso genético para essas características reprodutivas em bovinos da raça Gir por meio da seleção.

Palavras-chave: aspiração folicular, coeficiente de endogamia, *Bos indicus*, parâmetros genéticos.

ABSTRACT

The production and quality of oocytes recovered by follicular aspiration are influenced by genetic factors such as inbreeding. The objective of this study was to estimate genetic parameters and to evaluate the effects of inbreeding on the quantity and quality obtained from donor oocytes Gir through follicular aspiration guided by ultrasound. A univariate animal model was used to estimate genetic parameters and solutions for inbreeding coefficient for the income of oocytes retrieved. The oocyte aspiration was performed in 153 donors from different Gir families from the same herd, from May 2008 to April 2014. Data were collected from 1045 sessions (OPU), and the oocytes were counted, analyzed morphologically and classified into seven categories: with cumulus (grade I, grade II and grade III), without cumulus, expanded, or degenerated atresia, according to the number and arrangement of cumulus cells and appearance of the cytoplasm. Tests were conducted to identify the best-fit model, which resulted in the choice of the model which uses the effect of linear and quadratic coefficient of inbreeding as covariate. The average inbreeding coefficient calculated in the studied herd was 0.69%. It was observed that the increase of the inbreeding coefficient led to a decrease in the number of total and viable oocytes and to increase the number of non-viable oocytes. Heritability estimates ranged between 0.31 and 0.56 for the quantity and quality of oocytes, respectively. These results suggest that it is possible to achieve genetic progress for these reproductive traits in Gir cattle through the selection.

Keywords: Follicular aspiration, Genetic parameters, Gir, Inbreeding, Oocyte.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 247,2 milhões de cabeças (USDA – United States Department of Agriculture, 2013), destacando-se pelo potencial de crescimento, já que a produtividade é muito baixa. Segundo dados do USDA (2013), o rebanho nacional produziu cerca de 32,380 bilhões de litros de leite em 2013, o que corresponde a 5% da produção mundial e torna o Brasil o 4º maior produtor de leite do mundo.

Esse aumento na produção de leite e proteína animal tem sido reflexo do crescimento da população. No entanto ainda é necessário melhorar a produtividade do rebanho nacional e o desempenho reprodutivo, que é fundamental para a taxa de desfrute e determinação de maior ou menor disponibilidade de animais para seleção.

Para isso, as muitas tecnologias disponíveis para a reprodução deverão ser cada vez mais utilizadas para que o produtor consiga aumentar a eficiência de seus rebanhos e alcançar índices mais rentáveis economicamente. A utilização destas biotecnologias reprodutivas na produção animal, tais como a aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET), possibilita aumentar o número de descendentes por doadora de alto mérito genético, permitindo o aumento na intensidade de seleção e redução do intervalo entre gerações, que é um fator importante para o melhoramento do rebanho e, conseqüentemente, o aumento da produtividade (YANG et al., 1998).

O Brasil passou por um crescimento significativo no segmento dessas biotecnologias na última década. Uma grande expansão no número total de embriões produzidos pode ser notada a partir do ano 2000, sendo que em 2004 a produção anual superou a marca de 200.000 embriões. A partir de 2004 houve uma estabilização e posteriormente um declínio na utilização da MOET e a produção *in vitro* tornou-se a técnica de escolha para a produção de embriões no Brasil (VIANA et al., 2010). Durante o período de 2005 a 2010, a produção brasileira total se estabilizou com números em torno dos 300.000 embriões/ano (VIANA et al., 2012).

O principal motivo para a expansão da PIVE comercial foi a superação do maior limitador da superovulação: a inconsistente resposta ovariana a estímulos exógenos de FSH (hormônio folículo estimulante) em doadoras bovinas

(BARUSELLI et al., 2006). Entre outros fatores que contribuíram para a hegemonia desta biotécnica, estão o maior número de folículos disponíveis para aspiração nos ovários de doadoras zebuínas, e a qualidade e o potencial dos oócitos recuperados nestes animais - uma vez que 97,3% dos embriões bovinos produzidos no Brasil são de doadoras *Bos indicus* (VIANA et al., 2012).

O Gir tem grande relevância entre zebuínos, já que é considerada uma raça altamente adaptada às condições tropicais do Brasil, obtendo um bom resultado produtivo e reprodutivo. Além disso, a utilização de doadoras da raça Gir para produção de embriões F1 por meio do acasalamento com touros holandeses já é uma realidade no mercado de genética nas bacias leiteiras tradicionais e emergentes (BASSO et al., 2010).

Programas de melhoramento genético animal, se baseiam pela estimativa de valores genéticos para produção e a utilização de avançadas técnicas de reprodução, podem levar ao rápido progresso genético. Entretanto, devido a algumas raças apresentarem uma população relativamente pequena - dentre elas a raça Gir- a intensa utilização de alguns indivíduos ou famílias podem contribuir para o aumento excessivo do coeficiente de endogamia em gerações futuras. Esse tem sido um dos principais temas de pesquisas em todo o mundo, que tentam determinar e superar o efeito prejudicial da endogamia sobre o desempenho animal (QUEIROZ et al, 2000;. FALCÃO et al., 2001; GONZÁLES-RECIO et al., 2007; GÓMEZ et al., 2008).

Efetivamente, o estudo do efeito da endogamia sobre o desempenho reprodutivo - como a qualidade e quantidade de oócitos em bovinos – é útil para melhorar a produção das doadoras selecionadas para programas de OPU-PIVE. O conhecimento fisiológico sobre a eficiência da reprodução, aliado a estudos estatísticos sobre a variabilidade genética para essas características na população de Gir, pode gerar informações essenciais para a seleção de doadoras com maior potencial de produção de oócitos em quantidade e qualidade e, conseqüentemente, aumentar a eficiência desta biotécnica. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi estimar parâmetros genéticos e avaliar os efeitos de endogamia nessas características reprodutivas de bovinos da raça Gir.

2. OBJETIVOS

Estimar os parâmetros genéticos e avaliar a influência da endogamia na qualidade e quantidade de oócitos aspirados de doadoras da raça Gir.

3. HIPÓTESE

O aumento do coeficiente de endogamia pode influenciar a produção *in vitro* de embriões por meio da alteração do número de oócitos aspirados de doadoras raça Gir.

As características de quantidade e qualidade de oócitos em bovinos têm variabilidade genética.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2 LOCALIZAÇÃO, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO

No presente estudo, as aspirações foliculares foram realizadas na Fazenda do Basa, localizada no município de Leopoldina, Minas Gerais (225m de altitude, 21°31'55" latitude sul e 42°38'35" de longitude oeste) no período de maio de 2008 a fevereiro de 2012.

A topografia da região caracteriza-se por superfícies onduladas a montanhosas. O clima local, segundo a classificação de Köppen (1948), é o Aw, que corresponde a clima tropical úmido, com inverno seco, verão chuvoso e temperatura média do mês mais frio superior a 18°C.

As doadoras eram mantidas em piquetes rotacionados de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*) cv. Africana, com água e sal mineral *ad libitum* e suplementação a base de ração com 22% de proteína, silagem de milho e feno.

O controle sanitário dos animais foi realizado com vacinações contra IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), BVD (Diarreia Viral Bovina), Leptospirose, Carbúnculo, Raiva, Aftosa, além de um esquema estratégico no controle de ecto e endoparasitas.

4.3 DOADORAS

Foram utilizadas 153 doadoras de oócitos da raça Gir (*Bos indicus*) de diferentes famílias, com idades entre 15 e 164 meses. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação e foram submetidos ao mesmo manejo nutricional e sanitário durante o experimento.

4.4 ARQUIVO DE GENEALOGIA

A base de dados foi composta de informações armazenadas em fichas de genealogias da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ). A base era constituída de informações de pedigree tendo como informação mínima o pai e a mãe da vaca.

O arquivo completo de pedigree incluiu 559 animais, dos quais 555 formaram a população referência (ambos os pais conhecidos).

4.5 PUNÇÃO FOLICULAR (OPU) E RECUPERAÇÃO DE COC'S

Foram realizadas aspirações foliculares com a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom (OPU - *Ovum Pick Up*) nas doadoras pelos técnicos de uma empresa brasileira especializada na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Os procedimentos foram realizados utilizando-se equipamento de ultrassom Mindray DP 2200 (Mindray, Shenzhen, China) com transdutor microconvexo de 6,5 MHz conectado a guia de punção WTA (WTA®, Cravinhos, SP, Brasil) com cateteres 18G (JELCO® PLUS, Medex do Brasil, SP, Brasil) e linha de aspiração (WTA®) em tubos Corning® de 50 ml (Corning Glass Works, Corning, NY, Estados Unidos). A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de aspiração BV003d (WTA®) ajustada entre 72 e 82 mmHg.

Para evitar movimentos abruptos, desconforto e movimentos peristálticos que poderiam causar lesões nos animais, foram realizadas anestesia epidural, utilizando-se 3 mL de Lidocaína a 2% sem vasoconstrictor (Anestésico L, Pearson, São Paulo, Brasil). Para evitar contaminações, realizou-se assepsia da região do ânus e vulva dos animais e, em seguida, foi realizada a manipulação transretal para que os ovários fossem posicionados para facilitar a punção dos oócitos. Posteriormente, o transdutor acoplado à guia de biópsia e agulha foi introduzido pelo canal da vagina,

e os folículos com diâmetro igual e superior a 3 mm a serem aspirados foram posicionados no percurso da agulha e apresentados na tela do ultrassom.

Com o auxílio da bomba de vácuo, os folículos foram aspirados e o mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário. No final de cada procedimento, o sistema que liga a agulha à bomba de vácuo foi lavado com meio de manutenção composto de DPBS (DulbeCOC Mod. PBS, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) acrescido de 5,0 UI/ml de heparina sódica (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) para um tubo de 50 ml contendo o material aspirado.

Em seguida, os tubos contendo o material aspirado foram conduzidos ao laboratório das fazendas onde foram filtrados em filtro de colheita de embriões (EmCom®, Nutricell, Campinas, Brasil) e lavados três vezes com a mesma solução utilizada na aspiração para uma placa de Petri. Em seguida, foi realizada a seleção, contagem e classificação dos oócitos por meio de um estereoscópio, os quais foram classificados de acordo com o número e disposição das células do *cumulus* e aparência do citoplasma em oócitos com *cumulus* (grau I, grau II, ou grau III), sem *cumulus*, expandido, atresícos ou degenerados, segundo Lonergan (1992).

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram avaliados dados de 1045 sessões de punção folicular (OPU) realizadas entre maio de 2008 e abril de 2014. Todas as doadoras eram do mesmo rebanho e da mesma raça (Gir, *Bos indicus*). A recuperação de COC foi realizada pelas equipes de dois laboratórios de fertilização *in vitro*, utilizando-se meios e procedimentos padrões. Modelo animal unicaracterístico foi utilizado para estimar parâmetros genéticos e soluções para coeficiente de endogamia para qualidade e quantidade de oócitos recuperados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de recuperação de oócitos foram submetidos à análise estatística descritiva. As médias seguidas de desvio padrão, bem como as frequências de distribuição do número de COC's recuperados foram obtidos e são apresentados na Tabela 1. Sessões de OPU em que não foram recuperados nenhum oócito viável e/ou inviável foram excluídos. Na Tabela 2 são apresentadas as frequências dos

coeficientes de endogamia observados nas doadoras. Assim, foram contabilizadas 1023 sessões de OPU.

Tabela 1. Estatísticas descritivas para o intervalo de coleta, idade, coeficiente de endogamia, oócitos viáveis e oócitos inviáveis.

Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Intervalo de coleta (dias)	871	112,45	157,60	19,00	1.418,00
Idade (dias)	1023	1481,92	615,45	444,00	4.918,00
Coeficiente de endogamia	153	0,01	0,02	0	0,10
Oócitos viáveis	1023	15,25	10,01	1	71,00
Oócitos inviáveis	1023	8,91	6,61	1	66,00
Total	1023	24,17	14,44	2	112,00

Tabela 2. Frequências de classes de coeficientes de endogamia (F) observadas.

Classe de F	n	Frequência
1. 0,00	108	0,71
2. 0,0001-0,001	8	0,05
3. 0,001-0,01	9	0,06
4. 0,01-0,1	28	0,18

O coeficiente de endogamia (F) de cada animal no pedigree, definido como a proporção de loci que têm alelos idênticos por descendência (WRIGHT, 1923), foi calculado utilizando-se o programa ENDOG v4.8 (GUTIÉRREZ e GOYACHE, 2005).

O efeito de coeficiente de endogamia do indivíduo foi avaliado em modelos animais unicaracterística com componentes de variância obtidos por máxima verossimilhança restrita (REML). Também foi testado o modelo utilizando-se três características (oócitos totais, viáveis e inviáveis), do qual foram obtidas as correlações genéticas entre essas características.

Para cada característica, três diferentes modelos animais foram testados. No primeiro, o coeficiente de endogamia não foi incluído; No segundo modelo, o efeito linear do coeficiente de endogamia foi incluído; e no último modelo, foram adicionados os coeficientes de endogamia linear e quadrático.

Os dados foram analisados por meio de três modelos estatísticos, sendo eles:

$$y = \mu + GC + IO + I + I^2 + a + e;$$

$$y = \mu + GC + IO + I + I^2 + F + a + e \text{ e}$$

$$y = \mu + GC + IO + I + I^2 + F + F^2 + a + e.$$

Nos modelos apresentados, y representa o valor observado para cada característica; μ , uma constante geral presente em todas as observações; GC , o efeito fixo do grupo contemporâneo formado pela concatenação dos dados estação do ano, empresa e ano; IO , o intervalo de aspiração; I e I^2 , efeito linear e quadrático da idade do animal, respectivamente; F e F^2 , efeito linear e quadrático do coeficiente de endogamia, respectivamente; a , o efeito aleatório do animal; e e , o erro aleatório associado a cada observação.

As estações do ano foram classificadas como 1, para os meses de dezembro/janeiro/fevereiro do ano; 2, para os meses de março/abril/maio do ano; 3, para os meses junho/julho/agosto do ano; e 4, para os meses de setembro/outubro/novembro do ano.

De forma geral, os três modelos podem ser descritos sob a seguinte notação matricial:

$$y = X\beta + Za + e,$$

em que: y representa o vetor com os valores observados para cada característica (oócitos viáveis, inviáveis e totais); X , a matriz de incidência de efeitos fixos (grupo de contemporâneo formado pela concatenação das variáveis época e ano de coleta e empresa, e as covariáveis de idade da reprodutora, linear e quadrática, intervalo de coleta e coeficiente de endogamia, linear e quadrático); β , o vetor com as soluções para os efeitos fixos; Z , a matriz de incidência dos efeitos aleatórios (valor genético aditivo, efeito de ambiente permanente); a , o vetor com as soluções para os efeitos aleatórios; e e , o vetor com os resíduos.

Os componentes de variância foram estimados pelo método da Máxima Verossimilhança Residual (PATTERSON e THOMPSON, 1971) em análises unicaracterísticas, por meio do programa REMLF90, desenvolvido por Misztal (2001). Foram assumidas as pressuposições

$$\begin{bmatrix} y \\ a \\ e \end{bmatrix} \sim NMV \left\{ \begin{bmatrix} X\beta \\ \Phi \\ \Phi \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} V & ZG & R \\ GZ' & G & \Phi \\ R & \Phi & R \end{bmatrix} \right\},$$

em que: $V = ZGZ' + R$; $G = A\sigma_a^2$; A = matriz de numeradores dos coeficientes de parentesco de Wright; σ_a^2 = variância genética aditiva; $R = I\sigma_e^2$; I = matriz identidade; e σ_e^2 = variância residual.

As contribuições das inclusões das covariáveis coeficiente de endogamia linear e quadrático nos ajustes dos modelos foram verificadas pela análise dos valores da função de verossimilhança $(-2\ln(L))$ e critério de informação de Akaike (AIC, Akaike, 1987), definidos pelas seguintes equações:

$$-2\ln(L) = (N - p) \times \ln(2\pi) + \ln|V| + |X'V^{-1}X| + (y - X\beta)'V^{-1}(y - X\beta), \text{ e}$$

$$AIC = -2\ln(L) + 2k,$$

em que: N é o número total de observações; p é o posto da matriz de delineamento X ; k é o número de componentes de variância; e os demais termos já foram definidos anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de $-2\ln(L)$ e AIC foram mais próximos de zero para modelos estatísticos com inclusão do efeito do coeficiente de endogamia linear e quadrático (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da função de verossimilhança ($-2\ln(L)$) e do critério de informação de Akaike (AIC) nas análises de características de qualidade e quantidade de oócitos, em modelos estatísticos sem ou com a inclusão das covariáveis efeito da endogamia linear e quadrática.

Variáveis	Modelo endogamia	sem Modelo endogamia linear	Modelo endogamia linear + quadrático
Oócitos Viáveis	7146,33	7136,23	7119,48
Oócitos Inviáveis	6450,12	6442,24	6427,27
Oócitos Totais	7953,09	7942,85	7925,60

Com base nos valor do critério de ajuste considerado, ficou demonstrado que a inclusão das covariáveis efeito da endogamia linear e quadrática nos modelos estatísticos para análise da quantidade e qualidade dos oócitos recuperados após aspiração em vacas Gir resultou em melhoria significativa no ajuste dos modelos.

Não foram encontrados na literatura estudos descrevendo a influência da endogamia na qualidade e quantidade de oócitos. Bezdíček et al. (2014) estimaram o efeito da endogamia na produção e qualidade de embriões recuperados em vacas holandesas superovuladas. O modelo utilizado nesse estudo utilizou como efeito fixo um grupo contemporâneo formado por rebanho, ano e estação do ano e o efeito de coeficiente de endogamia linear como covariável na análise da produção e qualidade de embriões, o que sugere a importância dessa covariável. Estes autores concluíram que o aumento de 1% no coeficiente de endogamia da doadora resultou no aumento a proporção de embriões degenerados em 2,23% ($P < 0,05$).

Diversos estudos em bovinos leiteiros indicam que um alto coeficiente de endogamia afetam negativamente características de reprodução, tais como a idade ao primeiro parto, a taxa de concepção e o intervalo entre partos (PARLAND et al., 2007; BEZDÍČEK et al., 2008). Reis Filho (2006) observaram acréscimo de 1,66 dia para cada 1% de aumento no coeficiente de endogamia na idade ao primeiro parto

na raça Gir. Esse resultado foi semelhante ao relatado por Smith et al. (1998) para a raça Holandesa.

Alvarez et al. (2005) trabalharam com doadoras superovuladas com diferentes graus de endogamia, subdivididas em três grupos: F = 3% a 5,9%, F = 6% a 8,9%, e F = 9% a 30%. As contagens de embriões transferíveis nesses grupos foram de 7,0, 5,8 e 3,5, respectivamente. Portanto, quanto maior o grau de endogamia, menor é a quantidade de embriões transferíveis.

No rebanho estudado, a endogamia média foi 0,69%. Este valor foi inferior aos obtidos por Reis Filho et al. (2010) para o gado Gir (2,82%). Para essa mesma raça, Santana Júnior et al. (2014), encontraram endogamia média na população de 1,92%. O valor médio de endogamia encontrado no presente estudo foi semelhante ao encontrado por Peixoto et al. (2010) para a raça Guzerá, que encontraram endogamia média de 0,9% para a população.

Observou-se que o aumento da taxa de endogamia resultou em diminuição no número de oócitos totais (Figura 1) e viáveis (Figura 2) e aumento dos oócitos inviáveis (Figura 3).

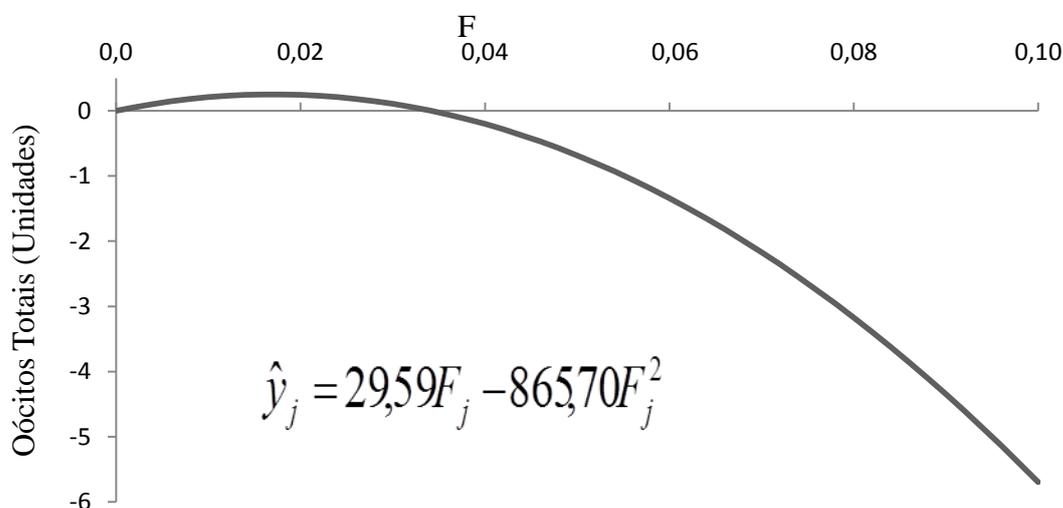


Figura 1. Efeito da endogamia no número de oócitos totais.

O coeficiente de endogamia de 0,1 pode comprometer a produção de até 6 oócitos totais por cada doadora.

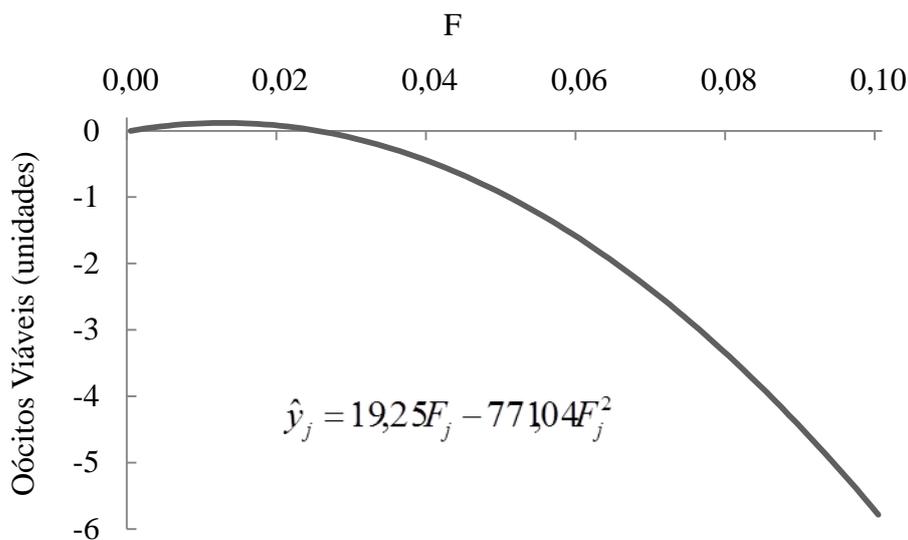


Figura 2. Efeito da endogamia no número de oócitos viáveis.

Em relação à produção de oócitos viáveis, o coeficiente de endogamia de 0,1 pode comprometer a produção de até 6 oócitos viáveis por cada doadora.

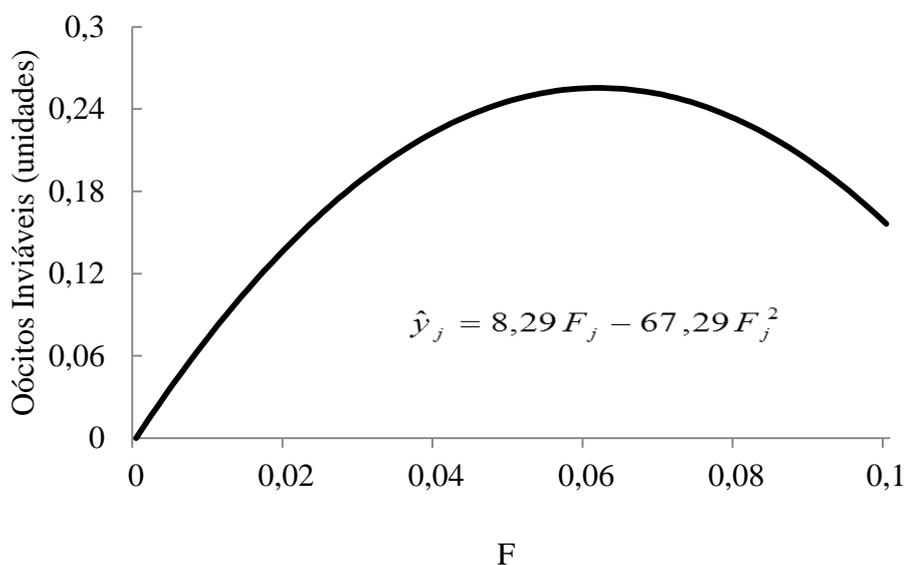


Figura 3. Efeito da endogamia no número de oócitos inviáveis.

Demonstrou-se que à medida que há um acréscimo no coeficiente de endogamia ocorre um aumento no número de oócitos inviáveis.

A partir do coeficiente de endogamia de 0,06, a curva apresenta leve declínio no gráfico, que pode ser justificado pelo pequeno número de doadoras com $F > 0,06$.

Apesar de não haver estudos avaliando a relação de endogamia e quantidade, ou eventual qualidade, de oócitos aspirados de doadoras da raça Gir, sabe-se que a depressão endogâmica causa comprometimento dos índices reprodutivos, dentre eles a produção e qualidade de embriões. Conforme discutido por George e Anderson (2003), o número de oócitos e embriões partilham a mesma base biológica, sendo razoável esperar correlação entre essas características.

Outra covariável utilizada no modelo estatístico foi a idade das doadoras nas quais elas foram aspiradas. Observou-se que o aumento da idade da doadora implica na diminuição linear da quantidade de oócitos totais (Figura 4).

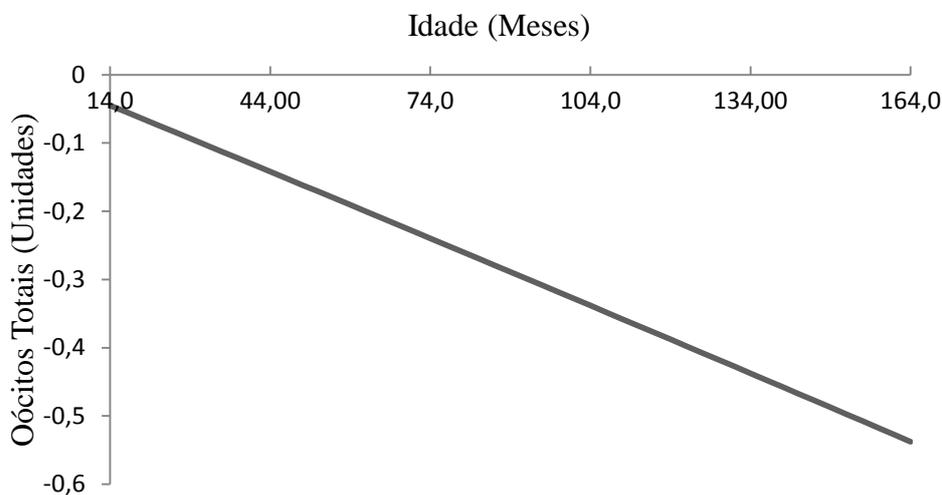


Figura 4. Efeito da idade no número de oócitos totais.

Baseado no coeficiente de regressão linear da idade, observou-se que o aumento da idade da doadora em um ano implicou na diminuição de 1,095 oócitos totais, o que ressalta a importância da inclusão dessa covariável no modelo. Sugere-se que doadoras mais jovens são mais eficientes na PIVE.

Ferreira et al. (2008), avaliando um rebanho da raça Gir, relataram um resultado semelhante, no qual o número de oócitos aspirados foi influenciado pela idade da doadora ($p < 0,001$). Esses autores descreveram uma queda de 1,58 estruturas por ano de idade da doadora, constatando que nas vacas acima de 12 anos a queda foi mais acentuada. A partir desta idade ocorre a redução média de duas estruturas para cada ano a mais na idade da doadora.

Características endócrinas e reprodutivas de envelhecimento dos ovários foram descritas numa série de estudos em que vacas senis foram comparadas com as filhas (MALHI et al., 2008). As concentrações circulantes de FSH foram consistentemente mais elevadas em vacas mais velhas do que nas suas filhas, e o modelo esperado de secreção de FSH e a onda de emergência - o recrutamento - foi mantido em vacas mais velhas. Ou seja, cada onda folicular ovariana foi precedida por uma onda de FSH circulante. Apesar dos elevados valores de FSH, menos folículos de 4-5 mm foram recrutados em cada onda folicular em vacas velhas quando comparada com a dinâmica das suas filhas.

Resultados de Malhi et al. (2008) sugerem que a fertilização ou taxas de clivagem diminuem com a idade. Menor número de embriões e uma proporção maior de oócitos não fertilizados e embriões degenerados foram recuperadas a partir de vacas velhas em comparação com as suas filhas. Essa conclusão foi validada pela observação de que o total de oócitos recuperados por doadoras mais velhas produziram menos de 50% de embriões quando comparadas com as suas filhas jovens.

O intervalo entre aspirações também foi utilizado como covariável no modelo estatístico. A média deste intervalo foi de 112,45 dias, variando de 19 a 1.418 dias. Devido aos intervalos entre aspirações serem altos (o intervalo mínimo foi de 19 dias) sugere-se que haja um maior efeito da idade do que do intervalo. A média elevada de dias de intervalo confunde-se, assim, na estimação do número de oócitos em relação à idade.

Alguns autores não observaram diferença na utilização de diferentes períodos entre aspirações na quantidade de oócitos, no número de folículos visualizados, no número de folículos aspirados, no número de oócitos recuperados, e na taxa de recuperação entre animais em aspirações realizadas uma ou duas vezes por semana (GIBBONS et al., 1994; BROADBENT et al., 1996).

Merton e colaboradores (2003) consideraram que a OPU, quando realizada de forma descontínua (entre o início do estro e 12 dias após), permitiu que as doadoras retornassem à ciclicidade de forma natural, não afetando a função ovariana.

Efetivamente, o efeito do coeficiente de endogamia linear e quadrático foi a covariável mais explorada nesse estudo por ser uma característica com comprovada

influência na reprodução, porém ainda desprovida de maiores estudos em relação à qualidade e quantidade de oócitos.

Em geral, a inclusão das covariáveis coeficiente de endogamia linear e quadrático nos modelos estatísticos não provocaram reduções expressivas nas variâncias e alterações nas herdabilidades de oócitos viáveis, inviáveis e totais (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas de variâncias genéticas aditivas ($\hat{\sigma}_a^2$), de ambiente permanente ($\hat{\sigma}_{pe}^2$) e residuais ($\hat{\sigma}_e^2$) e herdabilidades (\hat{h}^2) para características de oócitos viáveis, inviáveis e totais, em modelos estatísticos sem ou com a inclusão da covariável coeficiente de endogamia linear e linear+quadrático.

Modelos	Variáveis	$\hat{\sigma}_a^2$	$\hat{\sigma}_{pe}^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	\hat{h}^2	r
Sem endogamia	Oócitos Viáveis	66,29	3,25	49,06	0,56	0,59
	Oócitos Inviáveis	11,83	0,1990	27,57	0,30	0,30
	Oócitos Totais	118,8	2,337	114,0	0,51	0,51
	Oócitos Viáveis	66,84	3,25	49,02	0,56	0,59
Linear	Oócitos Inviáveis	11,96	0,19	27,57	0,30	0,31
	Oócitos Totais	120,2	2,27	114,0	0,51	0,52
	Oócitos Viáveis	67,73	3,269	48,97	0,56	0,59
Linear +quadrático	Oócitos Inviáveis	12,08	0,23	27,56	0,30	0,31
	Oócitos Totais	121,70	2,317	113,90	0,51	0,52

As estimativas de herdabilidade para a quantidade de oócitos totais recuperados foi alta (0,51). Dentre os oócitos totais, a recuperação de oócitos viáveis apresentou herdabilidade de 0,56, enquanto para oócitos inviáveis a herdabilidade foi moderada, de 0,30 (Tabela 3). De modo geral, é possível afirmar que essas características possuem herdabilidade moderada ou alta e que é possível obter mudanças genéticas na média da população por meio da seleção.

Os resultados obtidos neste estudo são comparáveis com os relatados por Merton et al. (2009). Entretanto, esses autores, ao estimarem parâmetros genéticos

da quantidade e qualidade de oócitos de doadoras holandesas, não consideraram o coeficiente de endogamia e o efeito da depressão endogâmica. Assim, os resultados encontrados diferiram daqueles descritos por esses autores, que encontraram herdabilidade moderada (0,25) para a característica numérica (número de COCs) com número médio de COCs recuperados de 7,8 variando 0-62 por sessão e baixa herdabilidade (0,09) para características qualitativas (qualidade de COCs).

A herdabilidade é um parâmetro específico de uma característica e de uma população sob condições ambientais específicas. Entretanto, mesmo considerando diferenças genéticas entre as populações avaliadas no presente estudo e naquele realizado por Merton et al. (2009), as diferenças observadas nas estimativas de herdabilidade de características correlacionadas ao rendimento e qualidade de oócitos foram altas e podem refletir, também, diferenças entre as raças.

Assim, essa divergência poderia ser explicada pelas características diferenciais das raças Holandesa e Gir. Deve-se considerar que o processo de seleção na raça Gir para aptidão leiteira é relativamente novo, sendo iniciado a partir de 1930 por instituições públicas e por um grupo de criadores e delineada somente em 1985 com o surgimento do Programa Nacional de Melhoramento do Gir. Nesse contexto, a seleção para as características de produção e qualidade de oócitos na raça Gir ainda é pouco explorada, se tornando uma importante característica em programas de melhoramento. A herdabilidade encontrada neste experimento para oócitos totais, viáveis e inviáveis indica grande variabilidade genética desta característica para a raça Gir, sendo passível de seleção.

Já a raça holandesa foi submetida a um processo de seleção de maior tempo, sendo que o foco principal de seleção foi a produção de leite. Sabe-se que esse objetivo único de seleção pode levar ao comprometimento dos índices reprodutivos. E estimativas de correlações genéticas entre características de produção e eficiência reprodutiva, obtidas a partir de análises de dados de campo, sugerem substancial antagonismo entre elas (SHORT et al., 1990).

Uma explicação fisiológica a esse antagonismo considera que a seleção para a produção de leite aumenta as concentrações sanguíneas de somatotropina e prolactina, que são estimuladores de lactação. Concomitantemente, ocorre diminuição da insulina, um hormônio que é antagônico à lactação e pode ser importante para o desenvolvimento folicular normal.

Outra característica a ser considerada para justificar as diferenças nos valores de herdabilidade é a média de recuperação de oócitos entre as duas raças. Como na raça Gir a recuperação de oócitos pode ser até quatro vezes maior que as observadas no gado holandês (PONTES et al., 2011), isso evidencia uma maior variabilidade genética para esta característica na raça Gir.

Para que uma característica possa ser incluída como critério de seleção, é necessário considerar, além da facilidade de medição e da herdabilidade, as correlações genéticas com outras características e com o objetivo de seleção.

As correlações genéticas entre as variáveis consideradas neste estudo foram mais altas entre oócitos inviáveis e totais em comparação com a correlação oócitos viáveis x totais (Tabela 4).

Tabela 4. Correlações genéticas (acima da diagonal) e correlações residuais (abaixo da diagonal) para as características oócitos viáveis, inviáveis e totais recuperados de aspiração de doadoras da raça Gir.

	Viáveis	Inviáveis	Total
Viáveis	-	0,48	0,24
Inviáveis	0,50	-	0,41
Total	0,90	0,83	-

Dessa forma, dos pares de características consideradas, observa-se que os oócitos inviáveis contribuem mais na proporção de oócitos totais, conforme explanado no capítulo 1, no qual observou-se que, com o aumento do número de oócitos totais, houve aumento da proporção de oócitos inviáveis. A correlação genética de 0,41 entre oócitos inviáveis e total sugere que, na prática, a mensuração de oócitos totais está correlacionada com aumento da proporção de inviáveis.

Um critério de seleção de doadoras deveria incluir também a qualidade de oócitos. Isso porque, conforme exposto, a quantidade e a qualidade de oócitos parecem ser características negativamente correlacionadas. Essa ideia é corroborada com o dado de Merton et al. (2009), que apresenta uma correlação genética de -0,12 entre qualidade de COC e o número de COC após aspiração de vacas da raça Holandesa.

De fato, diversos estudos buscam esclarecer a influência de fatores genéticos em características reprodutivas de doadoras submetidas a programas de OPU-PIVE

e MOET. De acordo com George e Anderson (2003), é um desafio elucidar os mecanismos que determinam a variação genética de características de interesse econômico, uma vez que geralmente são influenciadas pelo ambiente e controladas por muitos genes.

Portanto, os resultados encontrados neste estudo são bons candidatos à introdução no objetivo de seleção para aumentar a eficiência e eficácia de um programa de OPU-PIVE, já que demonstrou-se haver influência genética na produção de oócitos.

6. CONCLUSÃO

Os modelos estatísticos com efeito do coeficiente de endogamia linear e quadrático foram satisfatórios para análise do rendimento e qualidade de oócitos em doadoras da raça Gir.

O aumento do coeficiente de endogamia provoca perdas na eficiência da PIVE, devido à diminuição na produção de oócitos totais e aumento de oócitos inviáveis. Dessa forma, os acasalamentos devem ser cuidadosamente planejados, para evitar a depressão endogâmica nessa raça.

As características de rendimento e qualidade de oócitos recuperados por aspiração apresentam herdabilidades moderadas a altas e a seleção pode contribuir para modificação de suas médias, sendo possível alcançar o progresso genético para essas características e aumentar a eficiência das biotecnologias de produção *in vitro* de embriões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, R. H., DA SILVA, M. V. G. B., DE CARVALHO, J. B. P., BINELLI, M. Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from superovulated Mantiqueira breed cows. **Theriogenology** 64(8): 1669-1676, 2005.

BARUSELLI, P. S., SÁ FILHO, M. F., MARTINS, C. M., NASSER, L. F., NOGUEIRA, M. F., BARROS, C. M., BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology** 65(1): 77-88, 2006.

BASSO, A. C., SCHNEIDER, C. L., PONTES, J. H. F. Novas alternativas para a aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2010, Londrina, PR. Os melhores Pesquisadores nacionais e Internacionais gerando soluções para a pecuária Brasileira: **Anais...**Londrina, PR: UEL, 2010. 209p.

BEZDÍČEK, J., STÁDNÍK, L., MAKAREVICH, A., KUBOVIČOVÁ, E., LOUDA, F., HEGEDŮŠOVÁ, Z., HOLÁSEK, R., BERAN, J., NEJDLOVÁ, M. Effect of inbreeding on yield and quality of embryos recovered from superovulated Holstein cows. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science** 38: 681-685, 2014.

BEZDÍČEK, J., ŠUBRT, J., FILIPČÍK, R. The effect of inbreeding on milk traits in Holstein cattle in the Czech Republic. **Archiv Tierzucht** 51: 415–425, 2008.

BROADBENT, P. J., DOLMAN, D. F., WATT, R. G., SMITH, A. K., FRANKLIN, M. F. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology** 47: 1027-1040, 1996.

FALCÃO, S. A. J., FILHO, R. M.; MAGNABOSCO, C. U.; BOZZI, R., LIMA, F. A. M. Efeitos da Endogamia sobre Características de Reprodução, Crescimento e Valores Genéticos Aditivos de Bovinos da Raça Pardo-Suíça. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30(1): 83-92, 2001.

FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A., NAVARRO, P. A. A. S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32: 172-181, 2008.

GEORGES, M., ANDERSSON, L. Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. **Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology** 68:179-88, 2003.

GIBBONS, J. R., BEAL, W. E., KRISHER, R. L., FABER, E. G., PEARSON, R. E., GWAZDAUKAS, F. C. Effects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology** 42: 405-419, 1994.

GÓMEZ, D. A. A., CERÓN, M. F. M., RESTREPO L. F. B. Modelación de funciones de crecimiento aplicadas a La producción animal. **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias** 21: 39-58, 2008.

GONZALEZ-RECIO, O., LOPEZ D. M., GUTIERREZ, J. P. Inbreeding depression on female fertility and calving ease in Spanish dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 90: 5744-5752, 2007.

GUTIERREZ, J. P., GOYACHE, F. A note on ENDOG: a computer pro-gram for analysing pedigree information. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 122: 357–360, 2005.

KOEPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la Tierra**. Ciudad de México:Fondo de Cultura Economica. 1948. 466p.

LONERGAN, P. *Studies in the in vitro maturation, fertilization and cultive of bovine follicular oocytes*. 1992. 157f. Thesis (PhD). National University of Ireland, Dublin.

MALHI, P. S., ADAMS, G. P., MAPLETOFF, R. J., SINGH, J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. **Animal Reproduction Science** 109 (1-4), 100-109, 2008.

MERTON, J. S., ASK, B., ONKUNDI, D. C., MULLAART, E., COLENBRANDER, B., NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–*in vitro* production embryo-production program. **Theriogenology** 72: 885–893, 2009.

MERTON, J.S., DE ROOS, A.P.W., MULLAART E., DE RUIGH L., KAAL, L., VOS, P. L. A. M., DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology** 59: 651-674, 2003.

PARLAND, M.C.S., KEARNEY, J.F., RATH, M., BERRY, D. P. Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. **Journal of Dairy Science** 90: 4411–4419, 2007.

PATTERSON, H. D., THOMPSON, R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. **Biometrika** 58: 545-554, 1971.

PEIXOTO, M. G. C. D., POGGIAN, C. F., VERNEQUE, R. S., EGITO, A. A., CARVALHO, M. R. S, PENNA, V. M., BERGMANN, J. A. G., VICCINI, L. F., MACHADO, M. A. Genetic basis and inbreeding in the Brazilian Guzerat (*Bos indicus*) subpopulation selected for milk production. **Livestock Science** 131: 168-174, 2010.

PONTES, J. H. F., STERZA, F. A. M, BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES, B. V., RUBIN, K. C. P., SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology** 75: 1640-1646, 2011.

QUEIROZ, S. A. de, ALBUQUERQUE, L. G. de, LANZONI, N. A. Efeito da endogamia sobre características de crescimento de bovinos da raça Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia** 29:1014-1019, 2000.

REIS FILHO, J. C., LOPES, P. S., VERNEQUE, R. S., TORRES, R. A., TEODORO, R. L., CARNEIRO, P. L. S. Population structure of Brazilian Gir dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 2640-2645, 2010.

REIS FILHO, J.C. **Endogamia na Raça Gir**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa.

SANTANA JR., M. L., PEREIRA, R. J., BIGNARDI, A. B., EL FARO, L., TONHATI, H., ALBUQUERQUE, L. G. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. **Livestock Science** 163: 26-33, 2014.

SHORT, R. E., BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., BERARDINELLI, J.G., CUSTER, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science** 68: 799, 1990.

SMITH, L. A., CASSEL, B. G., PEARSON, R. E. The effects of inbreeding on the lifetime performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 81:2729-2737, 1998.

USDA. United States Department of Agriculture. **Data**. Disponível em <<http://www.ers.usda.gov/data-products.aspx#.UWwtwGcz6EA>>. Acesso em 14 jul. de 2014.

VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B., PALHAO, M. P., CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae** 38 (2): 661- 674, 2010.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction** 9 (1): 12-18, 2012.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Effects of gonadotropins and insulinlike growth factors-I and -II on *in vitro* steroid production by bovine granulosa cells. **Canadian Journal Animal Science**, v.78, p.587–597, 1998.

8. ANEXOS

8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO

1. TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa:

EFEITO DA EFICIÊNCIA PRODUTIVA NA PROBABILIDADE DE PREENHEZ DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E INFLUÊNCIA DA ENDOGAMIA NO RENDIMENTO E NA QUALIDADE DE OÓCITOS RECUPERADOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR NA RAÇA GIR LEITEIRO.

Nome do Pesquisador Responsável:

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Nome dos demais participantes:

Luiz Fernando Rodrigues Féres

Dr. João Henrique Moreira Viana

O Sr. está sendo convidado a autorizar a participação de seu animais nesta pesquisa que tem como objetivo avaliar a probabilidade de prenhez de embriões produzidos *in vitro* derivados de lotes de doadoras com diferentes índices de eficiência relativa. Além disso, também serão analisados dados de pedigree de doadoras da raça gir para avaliar a influência do coeficiente de endogamia na qualidade e quantidade de oócitos aspirados por punção folicular (OPU).

Para o primeiro objetivo citado desse trabalho, serão avaliados dados de 702 sessões de punção folicular (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIV) e de 2.456 transferências de embriões, realizadas entre maio de 2008 e fevereiro de 2012 nas Fazendas do Basa. As sessões serão estratificadas em quartis de acordo com a produção de COC das doadoras, ou estratificada em faixas, de acordo com a qualidade do COC e de pontos de eficiência de produção de embriões. As taxas de prenhez serão comparadas entre quartis ou faixas pelo método do qui-quadrado.

Por outro lado, para avaliar a influência do coeficiente de endogamia na qualidade e quantidade de oócitos na produção *in vitro*, serão utilizados dados de 1.045 sessões de punção folicular (OPU) e 153 doadoras Gir Leiteiro, realizadas entre maio de 2008 e abril de 2014. O coeficiente de endogamia de cada doadora será avaliado por meio do *software* ENDOG v4.8, a partir da matriz de parentesco desses animais. Posteriormente, será avaliada a influência desse coeficiente na qualidade e quantidade de oócitos aspirados por OPU.

Dessa forma, pretende-se melhorar os sistemas de cultivo *in vitro* para otimizar a produção de embriões e obter informações para o processo de seleção de doadoras de oócitos com maior eficiência na PIVE.

O Sr. (Sra.) tem a liberdade de se recusar a participar e, ainda, se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para os seus animais. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do

pesquisador ou dos outros professores participantes, se necessário através do telefone da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense.

Vale ressaltar que a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

Esperamos que este estudo gere informações importantes para melhorar a produção in vitro de embriões na raça Gir, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa servir como fonte de informações para médicos veterinários e criadores.

O Sr. não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Eu, Evandro do Carmo Guimarães, portador do RG, telefone (11)999109575, residente em São Paulo, e proprietário/responsável pelo rebanho do criatório Fazendas do BASA, espécie bovina, raça Gir Leiteiro, autorizo a utilização desses animais como sujeitos de pesquisa para fins didáticos e científicos.

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

Data: 15/05/2013

TELEFONES

Pesquisador:

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão (21) 2629-9526

Luiz Fernando Rodrigues Féres (32) 8812-5482

Dr. João Henrique Moreira Viana (32) 3311-7436

CEUA-UFF: (21) 2629-9950