**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

BRUNO DA COSTA PEREZ

Análise genética da produção *in vitro* de embriões em bovinos Guzerá

**PIRASSUNUNGA
SÃO PAULO – BRASIL
2016**

BRUNO DA COSTA PEREZ

Análise genética da produção *in vitro* de embriões em bovinos Guzerá

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro

**PIRASSUNUNGA
SÃO PAULO – BRASIL
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

B186a	<p>Perez, Bruno da Costa Análise genética da produção <i>in vitro</i> de embriões em bovinos Guzerá. / Bruno da Costa Perez – Pirassununga, 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Carvalho Balieiro</p> <p>Unitermos: 1. Endogamia 2. Modelo Misto Generalizado 3. Parâmetros genéticos 4. Reprodução artificial em Bovinos, taxas I. Título.</p>
-------	---

BRUNO DA COSTA PEREZ

Análise genética da produção *in vitro* de embriões em bovinos Guzerá

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Júlio Cesar de Carvalho Balieiro

Professor, Dr. - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo - FMVZ/USP, Brasil
Orientador

Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto

Pesquisadora, Dra. - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPGL/EMBRAPA, Brasil

Ricardo Vieira Ventura

Professor. Dr. - Department of Animal and Poultry Science
University of Guelph, Canadá

*“The greatest enemy
of knowledge is not ignorance,
it is the illusion of knowledge.”*

- Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, Ana Maria Porto da Costa e Paulo Cavalcante Apratto Jr., por serem meus exemplos de vida. Eu não estaria aqui sem eles.

Agradeço a Mariane Verinaud Soares, pelo amor, cumplicidade e amizade incondicional. Obrigado por me apoiar em todos os momentos e por fazer minha vida (muito) mais feliz.

Agradeço a minha avó, Blandina do Carmo Porto da Costa, por me ajudar sem medir esforços, em qualquer momento.

Agradeço aos meus irmãos, Caio e Gabriel, por me ensinarem tanto sobre a vida, por serem meus grandes e eternos amigos. Sigam sempre seus sonhos.

Agradeço aos meus cães, pois sem eles a vida seria consideravelmente menos proveitosa.

Obrigado ao Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, meu orientador, pela oportunidade de conduzir minha pesquisa na FZEA/USP, por sua receptividade em me orientar durante o mestrado, pela liberdade concedida a mim para o desenvolvimento deste projeto, pela prontidão em discutir minhas questões e ideias, por me apoiar nos momentos difíceis, pela confiança em minha capacidade e pelas palavras sinceras.

Obrigado a Dr^a. Maria Gabriela Campolina Peixoto Diniz, pela paciência, pela orientação incansável, por confiar a mim os dados utilizados nesse trabalho. Acima de tudo, obrigado por me mostrar a beleza do pensamento científico.

Obrigado ao Prof. Dr. Ricardo Ventura pelas palavras de sabedoria, por acreditar nas minhas capacidades, pelo apoio e amizade. Há muito mais a ser realizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodolpho de Almeida Torres Filho, pelos valiosos ensinamentos, tantos pessoais como profissionais, durante meu período de graduação.

Obrigado ao Prof. Dr. Fabyano Fonseca e Silva, pela ajuda e atenção concedidas a mim.

Agradeço ao Dr. Frank Ângelo Tomita Bruneli, pelo apoio durante todo esse período.

Obrigado à Dr^a. Anna Marie Holand, por me apresentar e discutir novas ideias.

Obrigado aos amigos Mateus Freua, Lilian Ribeiro e Pedro Vital Brasil pela troca de experiências e conhecimento, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Agradeço a todos que, de alguma forma, me apoiaram e contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

RESUMO

PEREZ, B.C. **Análise genética da produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá.** 2016, 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2016.

RESUMO: O objetivo dessa pesquisa foi avaliar aspectos genéticos que relacionados à produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. O primeiro estudo focou na estimação de (co) variâncias genéticas e fenotípicas em características relacionadas a produção de embriões e na detecção de possível associação com a idade ao primeiro parto (A_{FC}). Foi detectada baixa e média herdabilidade para características relacionadas à produção de oócitos e embriões. Houve fraca associação genética entre características ligadas a reprodução artificial e a idade ao primeiro parto. O segundo estudo avaliou tendências genéticas e de endogamia em uma população Guzerá no Brasil. Doadoras e embriões produzidos *in vitro* foram considerados como duas subpopulações de forma a realizar comparações acerca das diferenças de variação anual genética e do coeficiente de endogamia. A tendência anual do coeficiente de endogamia (F) foi superior para a população geral, sendo detectado efeito quadrático. No entanto, a média de F para a sub- população de embriões foi maior do que na população geral e das doadoras. Foi observado ganho genético anual superior para a idade ao primeiro parto e para a produção de leite (305 dias) entre embriões produzidos *in vitro* do que entre doadoras ou entre a população geral. O terceiro estudo examinou os efeitos do coeficiente de endogamia da doadora, do reprodutor (usado na fertilização *in vitro*) e dos embriões sobre resultados de produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. Foi detectado efeito da endogamia da doadora e dos embriões sobre as características estudadas. O quarto (e último) estudo foi elaborado para comparar a adequação de modelos mistos lineares e generalizados sob método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML) e sua adequação a variáveis discretas. Quatro modelos hierárquicos assumindo diferentes distribuições para dados de contagem encontrados no banco. Inferência foi realizada com base em diagnósticos de resíduo e comparação de razões entre componentes de variância para os modelos em cada variável. Modelos Poisson superaram tanto o modelo linear (com e sem transformação da variável) quanto

binomial negativo à qualidade do ajuste e capacidade preditiva, apesar de claras diferenças observadas na distribuição das variáveis. Entre os modelos testados, a pior qualidade de ajuste foi obtida para o modelo linear mediante transformação logarítmica ($\text{Log}_{10} X + 1$) da variável resposta.

Palavras chave: endogamia, comparação de modelos, gado zebu, parâmetros genéticos, punção ovariana, reprodução artificial.

ABSTRACT

PEREZ, B.C. **Genetic analysis of *in vitro* embryo production in Guzará cattle.** 2016, 109p. Dissertation (Master thesis) – College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (FZEA/USP), 2016.

ABSTRACT: The objective of this research was to evaluate genetic aspects permeating *in vitro* embryo production in Guzará cattle. The first study aimed for estimating genetic and phenotypic (co)variances among embryo production traits and detecting possible genetic association with the age at first calving (A_{FC}). Low and medium heritabilities were detected for oocyte and embryo production traits. A weak genetic association between artificial reproduction traits and A_{FC} was identified. The second study evaluated genetic and inbreeding trends in the Brazilian Guzará population. Female donors and *in vitro* produced embryos were considered as two subpopulations in order to perform comparisons and infer over differences in inbreeding and genetic annual variations. Embryos' subpopulation showed higher genetic gains for age at first calving and milk production than donors' subpopulation and the general population. Higher annual mean inbreeding values were also detected for the embryos' subpopulation. The third study examined the effects of donor, sire (used for *in vitro* fertilization) and embryos' inbreeding coefficient over *in vitro* embryo production traits in Guzará cattle. Donors' and embryos' inbreeding effects over the analyzed traits were detected. Fourth and final study was designed to compare the performance of Linear and Generalized Linear Mixed Models under Restricted Maximum Likelihood method when fitting discrete variables. Four hierarchical models assuming different distributions for the

response variable were fit to the (count) data. Inference was performed upon residual diagnostics and comparison of variance component ratios between models within each trait. Poisson models outperformed both linear (with and without variable transformation) and negative binomial models for goodness of fit and predictive ability despite clear differences in each trait's distribution. Logarithmic transformation ($\log_{10} X + 1$) showed lowest goodness of fit among all models tested.

Keywords: artificial reproduction, genetic parameters, inbreeding, model comparison, ovum-pick-up, zebu cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Tendências do coeficiente de endogamia para a população geral (1.A - T_{POP}), doadoras (1.B - D_{POP}), e para os embriões produzidos <i>in vitro</i> (1.C - E_{POP}) observadas no período estuda.....	47
Figura 1.2 Tendências genéticas para A_{FC} na população geral (3.A - T_{POP}), na subpopulação de doadoras (3.B - D_{POP}), e na subpopulação de embriões produzidos <i>in vitro</i> (3.C) observadas no período estudado.....	50
Figura 1.3 Tendências genéticas para PL_{305} na população geral (3.A - T_{POP}), na subpopulação de doadoras (3.B - D_{POP}), e na subpopulação de embriões produzidos <i>in vitro</i> (3.C) observadas no período estudado.....	52
Figura 1.4 Tendências genéticas para N_{OV} (4.A); P_{OV} (4.B); N_{EMB} (4.C) e P_{EMB} (4.D) estimada na subpopulação de doadoras (por ano de nascimento).....	54
Figura 2.1 Efeito do coeficiente de endogamia da doadora sobre variáveis de contagem relacionadas a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	78
Figura 2.2 Efeito do coeficiente de endogamia da doadora sobre variáveis percentuais relacionadas a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	79
Figura 2.3 Efeito do coeficiente de endogamia do embrião sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Número de observações (N), medianas, médias, desvios padrão (SD), coeficientes de variação (CV), e amplitudes das características analisadas (variáveis não transformadas).	23
Tabela 1.2 Estimativas de variância ambiental (σ_e^2), variância genética aditiva (σ_a^2), variância de ambiente permanente (σ_{pe}^2), variância fenotípica (σ_p^2), variância do efeito de touro (sêmen usado na fertilização <i>in vitro</i>) (σ_b^2), proporção do total da variância referente ao efeito de touro (b^2), e repetibilidade (r) das variáveis estudadas (transformada e não transformada).....	24
Tabela 1.3 Estimativas de herdabilidade (diagonal), correlações genéticas (abaixo da diagonal), e correlações fenotípicas (acima da diagonal) das variáveis analisadas e seus erros padrão associados (entre parênteses).....	25
Tabela 1.4 Coeficientes de correlação de Pearson (ρ_{xy}) entre os valores genéticos estimados para a idade ao primeiro parto (A_{FC}) e a variáveis relacionadas à produção de embriões na população estudada (n=2.055).....	25
Tabela 2.1 Número de observações (N), reprodutores, vacas, médias, desvios padrão (SD), valores mínimo e máximo para as características analisadas (variáveis na escala da variável resposta) e número de grupos contemporâneos (CG).....	41
Tabela 2.2 Estimativas da variância ambiental (σ_e^2); variância genética aditiva (σ_a^2); variância de ambiente permanente (σ_{pe}^2); variância fenotípica (σ_p^2); variância do efeito do touro (sêmen usado na IVF) (σ_b^2) e a proporção do total da variância referente ao efeito do touro ($\hat{b}^2$) para as variáveis estudadas (transformadas e não transformadas).....	43
Tabela 2.3 Valor médio de F, média de F para indivíduos endogâmicos e amplitude dos valores de F para os bancos de dados analisados (T_{POP} , D_{POP} , E_{POP}).....	44
Tabela 2.4 Frequência (N) e percentual (%) de indivíduos (ou embriões produzidos <i>in vitro</i>) de acordo com as classes do coeficiente de endogamia.....	48
Tabela 2.5 Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores genéticos estimados para A_{FC} , PL_{305} e a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	55
Tabela 3.1 Mediana, média, desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características analisada.....	62

Tabela 3.2 Efeitos da endogamia da doadora; do reprodutor e do embrião incluídos em cada variável estudada.....	70
Tabela 3.3 Frequência (N) e percentual (%) dos indivíduos (ou sessões de IVF) de acordo com classes de coeficiente de endogamia.....	71
Tabela 3.4 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia da doadora (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de oócitos e embriões (variáveis de contagem).....	72
Tabela 3.5 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia da doadora (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de oócitos e embriões (variáveis percentuais).....	73
Tabela 3.6 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia do reprodutor (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção embriões (variáveis percentuais).....	76
Tabela 3.7 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia do embrião (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de embriões (variáveis percentuais).....	77
Tabela 4.1 Número de observações (N), medianas, médias, desvio padrão (SD), valores de mínimo e máximo e a frequência de zeros encontrada para as características analisadas.....	91
Tabela 4.2 Estimativas de variância genética aditiva (σ^2_a), variância de ambiente permanente (σ^2_{pe}), variância ambiental (σ^2_e), variância do efeito do reprodutor (cujo sêmen foi usado na IVEP) (σ^2_b), herdabilidade (h^2) e repetibilidade (r) para as características e modelos considerados.....	99
Tabela 4.3 Parâmetros de dispersão (ϕ) estimados para os modelos POI e NGB.....	100
Tabela 4.4 Valores do erro quadrático médio (MSE) e do erro quadrático médio de predição (MSEP) entre valores observados e preditos para todas as combinações modelo-característica estudados.....	101
Tabela 4.5 Coeficientes de correlação de Spearman (ranking) entre os valores genéticos estimados para os animais avaliados (acima da diagonal) e percentual de indivíduos selecionados em comum considerando os 10% maiores valores genéticos estimados (abaixo da diagonal) pelos modelos propostos.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

Grupos contemporâneos (CG)
Valores genéticos estimados (EBV)
Transferência de embriões (ET)
Modelo linear misto generalizado (GLMM)
Produção *in vitro* de embriões (IVEP)
Fertilização *in vitro* (IVF)
Coeficiente de endogamia (F)
Modelo linear misto (LMM)
Máximo (MAX)
Erro quadrático médio (MSE)
Erro quadrático médio de predição (MSEP)
Mínimo (MIN)
Múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET)
Punção ovariana (OPU)
Máxima verossimilhança restrita (REML)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Revisão de Literatura	1
1.1.1 A raça Guzerá.....	1
1.1.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	2
1.1.3 Endogamia.....	5
1.1.4 Estimação de componentes de variância para variáveis discretas.....	6
1.2 Referência bibliográfica.....	8
2. CAPÍTULO 1. Análise genética da produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Guzerá e sua associação com a idade ao primeiro parto	16
2.1 Introdução	18
2.2 Material e Métodos.....	19
2.2.1 Animais.....	19
2.2.2 Punção ovariana e produção <i>in vitro</i> de embriões	20
2.2.3 Estimação de parâmetros genéticos.....	21
2.3 Resultados	23
2.4 Discussão.....	26
2.4.1 Punção ovariana e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	26
2.4.2 Herdabilidades para características relacionadas a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	26
2.5 Conclusão	28
2.6 Referência bibliográfica.....	28
3 CAPÍTULO 2. Aspectos genéticos da produção <i>in vitro</i> de embriões em rebanhos da raça Guzerá no Brasil	32
3.1 Introdução	34
3.2 Material e Métodos.....	37
3.2.1 Dados	37
3.2.2 Punção ovariana e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	38
3.2.3 Estimação dos componentes de variância	38
3.3 Resultados e Discussão.....	40
3.3.1 Tendências de endogamia.....	44
3.3.2 Tendências genéticas.....	48

3.3.2.1 Idade ao primeiro parto	48
3.3.2.2 Produção de Leite.....	51
3.3.2.2 Características da produção de oócitos e embriões	53
3.3.3 Associação genética entre características produtiva, reprodutiva e relacionadas a produção in vitro de embriões	55
3.4 Conclusão	56
3.5 Referências bibliográficas	57
4 CAPÍTULO 3. Efeitos da endogamia sobre a produção in vitro de embriões em bovinos da raça Guzerá.....	62
4.1 Introdução	64
4.2 Material e Métodos.....	66
4.2.1 Dados	66
4.2.2 Punção ovariana e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	67
4.2.3 Análise e modelos propostos.....	68
4.3 Resultados	70
4.4 Discussão.....	74
4.4.1 Endogamia da doadora	75
4.4.2 Endogamia do reprodutor	79
4.4.3 Endogamia dos embriões	80
4.5 Conclusão	81
4.6 Referências bibliográficas	82
5 CAPÍTULO 4. Comparação de modelos Lineares, Poisson e binomial negativo para análise genética da produção in vitro de embriões de doadoras da raça Guzerá em abordagem frequentista.....	86
5.1 Introdução	88
5.2 Material e Métodos.....	90
5.2.1 Dados	90
5.2.2 Punção ovariana e da produção <i>in vitro</i> de embriões.....	91
5.2.3 Modelos estatísticos	91
5.2.4 Estimativas de herdabilidade.....	94
5.2.5 Comparação de Modelos.....	95
5.2.5.1 Erro quadrático médio (MSE).....	95
5.2.5.2 Capacidade de predição	96
5.2.5.3 Correlação de Spearman entre EBVs.....	96

5.3 Resultados	97
5.3.1 Estatística descritiva e efeitos fixos	97
5.3.2 Componentes de variância, herdabilidade e repetibilidade	97
5.3.3 Comparação de modelos e capacidade preditiva	100
5.3.4 Correlação entre valores genéticos estimados	101
5.4 Discussão.....	103
5.4.1 Componentes de variância estimados.....	103
5.4.2 Comparação geral dos modelos	104
5.4.3 Qualidade do ajuste e capacidade preditiva em validação cruzada	106
5.4.4 Correlação e similaridades entre rankings de valor genético estimados	107
5.5 Conclusão	108
5.6 Referências bibliográficas	108

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 A raça Guzerá

A raça Guzerá é originária da Índia, mais precisamente do deserto de Cutch, na região noroeste do estado de Gujarat, onde também é chamada de *Kankrej*. A raça também é conhecida como *Vadhiyari* e *Wagad* em estados adjacentes (JOSHI; PHILIPS, 1953). Localizado na fronteira entre a Índia e o Paquistão, o estado de Gujrat apresenta extremas condições climáticas, com ampla variação de temperaturas e ar seco no verão. Sobre tais condições severas a raça se desenvolveu e estabeleceu-se entre os rebanhos bovinos.

Os primeiros animais Guzerá chegaram ao Brasil em meados de 1870. Nesse período a raça assumiu papel relevante nos rebanhos nacionais, assim prevalecendo até a década de 1920. A partir desta data, sua ampla utilização em cruzamentos e, principalmente, o uso de animais Guzerá na criação da raça Indubrasil, contribui para uma drástica redução dos rebanhos puros no país. Durante a importação de animais *Bos indicus* na década de 1970, onde animais da raça Nelore ganharam atenção expressiva, os rebanhos Guzerá permaneceram numericamente reduzidos. Atualmente, devido a sua conhecida capacidade de adaptação às condições do clima tropical, em particular ao semiárido, e do seu notável sucesso em sistemas de produção de uso de insumos (PEIXOTO et al., 2006b), a raça Guzerá assume grande importância na região Nordeste do Brasil, apresentando vantagens sobre outras raças zebuínas. Enquanto, na Índia, o animal *Kankrej* tem um importante papel social, sendo comumente utilizado para tração e produção de leite, sua história nos rebanhos brasileiros revelou a dupla aptidão da raça Guzerá, qualificando-a para produção de carne e leite. (PENNA et al., 2002).

No Brasil, portanto, os rebanhos puros Guzerá tem sido selecionados para leite, carne, ou ambas aptidões. (PEIXOTO et al., 2010). A raça também é famosa por sua resistência a parasitas e pronunciada habilidade materna. Animais Guzerá, assim como de outras raças zebuínas, contribuem fortemente

para a capacidade adaptativa e desempenho superior dos cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus*, que são os grupos genéticos predominantes nos sistemas de produção animal no Brasil (MADALENA, 2012).

1.1.2 Produção *in vitro* de embriões

Tecnologias de reprodução artificial, nomeadamente a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) e a punção ovariana seguida de fertilização *in vitro* (OPU/IVF), de acordo com Nicholas (1983), são tão importantes para reprodução e melhoramento de fêmeas bovinas, como a inseminação artificial um dia para os machos. A introdução destas biotecnologias permitiu aos rebanhos selecionadores multiplicar não apenas touros de alto mérito genético, mas também matrizes que se destacam na população.

No Brasil, o recente sucesso dos programas de melhoramento das raças zebuínas contribuiu para a crescente demanda de tecnologias reprodutivas, de forma a garantir uma maior disseminação de indivíduos geneticamente superiores e aprimorar a acurácia de seleção (REICHENBACH, 2002). O país, atualmente, é uma das poucas fontes de germoplasma *Bos indicus* melhorado por métodos modernos de testagem e de avaliação genética, especialmente para raças zebuínas leiteiras (MADALENA, 2012).

Aplicações da reprodução artificial em genética e melhoramento animal foram amplamente discutidas na literatura (LAND; HILL, 1975; LOHUIS, 1995; NICHOLAS, 1977, 1979, 1989, 1996; NICHOLAS; SMITH, 1983; VAN VLECK, 1981). Na década passada, a produção *in vitro* de embriões, especificamente, emergiu como uma ferramenta comercial. No caso das raças zebuínas, também emergiu como uma alternativa à grande variação nos resultados obtidos com tecnologia de MOET, transformando a OPU/IVF na opção preferida para obtenção de embriões de doadoras *Bos indicus* (e cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus*) (VIANA et al., 2012).

Desde sua introdução nos rebanhos bovinos brasileiros, a produção *in vitro* de embriões (IVEP) foi, predominantemente, usada em rebanhos de corte. No entanto, a partir de 2004, favorecida pelo surgimento do sêmen sexado como uma ferramenta comercialmente disponível, a IVEP foi introduzida em rebanhos

leiteiros se fortaleceu (CAMARGO et al., 2010; VIANA et al., 2010). Hoje, a IVEP é considerada uma tecnologia amadurecida (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2006) e, por uma diversidade de autores, a sucessora da técnica de MOET, como ferramenta de multiplicação de animais de mérito genético superior (BOUSQUET et al., 1999; NICHOLAS, 1996; THIBIER et al., 1990).

Para Nicholas, (1996) e Van Wagtendonk-de Leeuw et al. (2006), OPU/IVF/ET possui inúmeras vantagens sobre a biotécnica de MOET, entre elas, é desnecessária a exposição das doadoras à tratamento hormonal para obtenção de embriões viáveis, permitindo menores intervalos entre sessões e, portanto, alcançando um maior número de bezerros por vaca/ano. Outras vantagens incluem a possibilidade da utilização de sêmen de mais de um touro na fertilização *in vitro* (WOOLLIAMS; WILMUT, 1998) contribui para um controle aprimorado da endogamia, mesmo quando aplicada em larga escala. Apesar de comumente criticada, do ponto de vista de bem-estar animal, maiores ganhos genéticos podem ser alcançados quando a OPU/IVF é aplicada em fêmeas pré-púberes (BETTERIDGE et al., 1989; TANEJA et al., 2000).

No geral, vacas *Bos indicus* têm apresentado resultados superiores à punção ovariana quando comparadas com fêmeas *Bos taurus* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2006). Dentre os fatores comumente associados com o sucesso das fêmeas zebuínas à IVEP são um maior número de folículos recrutados por onda folicular (VIANA et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 1997), assim como um maior número de ondas foliculares por ciclo e particularidades relacionadas a competência do folículo dominante (GIMENES et al., 2008).

Pontes et al. (2010), estudando a viabilidade da produção *in vitro* de embriões, compararam vacas das raças Gir, Holandesa e seus cruzamentos, obtendo médias de $12,1 \pm 3,9$ (Gir), $8,0 \pm 2,7$ (Holandesa), $16,8 \pm 5,0$ (3/4 Gir) e $24,3 \pm 4,7$ (1/2 Gir x 1/2 Holandesa) para o número de oócitos viáveis produzidos. Merton et al. (2009), trabalhando com 1508 vacas da raça Holandesa em um programa de produção de embriões, reportaram médias de 7,8 oócitos viáveis. Na raça Nelore, médias de $25,6 \pm 15,3$ e $9,4 \pm 5,3$ foram reportadas para o total de folículos aspirados e número de oócitos viáveis que geraram embriões (PONTES et al., 2009). Gama Filho (2006), ao estudar doadoras da raça Guzera

apresentou médias de $13,33 \pm 5,33$ e $15,40 \pm 3,75$ para o número de oócitos obtidos por punção ovariana de vacas, hormonalmente (GnRH) estimuladas e não estimuladas, mas não foi detectada significância estatística ($P > 0.05$) entre os grupos estudados.

Ampla diversidade de fatores influenciando na produção de embriões por meio de punção ovariana seguida de fertilização *in vitro* têm sido relatada. Autores têm sugerido efeito significativo do intervalo entre sessões (MERTON et al., 2009; PONTES et al., 2009), da estação (RUST et al., 2009), da idade da doadora à OPU (CAMARGO et al., 2005), da pré-estimulação hormonal (BLONDIN et al., 1997; DE ROOVER et al., 2008), da técnica de punção ovariana (BOLS et al., 1996; MERTON et al., 2009), qualidade de treinamento dos técnicos (MERTON et al., 2009, 2003), da qualidade e quantidade dos folículos disponíveis presentes nos ovários da doadora (BLONDIN et al., 2002; IGUMA et al., 2010; MERTON et al., 2003; VIANA et al., 2012), da fertilidade do touro cujo sêmen é utilizado na IVF (CAMARGO et al., 2002, 2006) e de fatores associados à maturação, cultura e do ambiente *in vitro* em geral (CAMARGO et al., 2010; QUINN et al., 2004).

Apesar da importância da OPU/IVEP para os rebanhos bovinos brasileiros, pouca atenção tem sido dada aos fatores genéticos envolvidos na produção *in vitro* de embriões. Merton et al. (2009) realizaram um único estudo conhecido, encontrando para a raça Holandesa, herdabilidades de $0,25 \pm 0,06$; $0,09 \pm 0,02$; $0,19 \pm 0,04$; $0,21 \pm 0,04$; $0,16 \pm 0,04$; $0,07 \pm 0,02$; $0,12 \pm 0,03$ e $0,10 \pm 0,03$ para o número de oócitos viáveis, proporção de oócitos Grau I (sobre o total de oócitos viáveis aspirados), número de embriões clivados, proporção de embriões clivados, número de embriões ao dia 7, proporção de embriões ao dia 7, número de embriões viáveis ao dia 7 e a proporção de embriões viáveis ao dia 7 sobre o total de oócitos produzidos, respectivamente.

Uma das primeiras aplicações comerciais da IVEP foi a produção de embriões de vacas que por alguma razão não respondiam a técnica de MOET ou estavam impossibilitadas de emprenhar ou gestar um bezerro (LOONEY et al., 1994; MAPLETOFT; HASLER, 2005; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2006). Ao assumir que exista um componente genético permeando as desordens reprodutivas em vacas, genótipos associados à infertilidade podem

ter sido transmitidos às gerações seguintes devido à adoção, em larga escala, da produção *in vitro* de embriões.

1.1.3 Endogamia

Endogamia refere-se ao acasalamento cujo parentesco dos progenitores é maior do que a média da população (LUSH, 1945), tendo como principal consequência o aumento do número de alelos em homozigose na população.

O coeficiente de endogamia, frequentemente indicado por “F”, quantifica a probabilidade de um indivíduo receber, em um mesmo locus, dois alelos idênticos, oriundos de um ancestral comum a seus pais (FALCONER, 1989). Esta teoria é baseada no conceito de “identidade por descendência”, sugerido por Falconer (1989). O valor de F é atribuído a cada indivíduo e é definido pela metade do parentesco entre seus progenitores.

Entre as principais implicações do aumento da endogamia em rebanhos bovinos está a redução da variação genética, diminuição da heterozigose e consequente depressão endogâmica (HINRICHS; TALLER, 2011; SMITH et al, 1998). O conceito de depressão endogâmica é fundamental para compreender a aplicação prática da endogamia na genética quantitativa e refere-se aos efeitos negativos na média fenotípica de características de interesse econômico na população associada à indivíduos endogâmicos (JOHANSSON; RENDEL, 1971). A depressão endogâmica tem maior impacto sobre características relacionadas à saúde e sobrevivência (FALCONER; MACKAY, 1996), também chamadas de características funcionais (GROEN, et al., 1997). Diversos autores têm reportado impactos negativos da endogamia sobre a produção de leite (MIGLIOR et al., 1995) e características ligadas a fertilidade (THOMPSON et al., 2000; MC PARLAND et al., 2007) em animais *Bos taurus*.

Na raça Holandesa, o aumento de 1% no coeficiente de endogamia foi associado à diminuição de 30 Kg em leite no fim da lactação e a um aumento de 0,31 dias no intervalo entre partos (CROQUET et al., 2006; WIGGANS et al., 1995; SMITH et al., 1998). Em vacas Jersey, Wiggans et al. (1995) observaram que para cada 1% de aumento em F, era esperada uma diminuição de 21.30 Kg e 1,03 Kg para, respectivamente, a produção de leite e proteína ao fim da

lactação. Thompson et al., 2000 sugeriram, também para a raça Holandesa, que novilhas com coeficiente de endogamia eram mais tardias ao primeiro parto. Além disso, os autores reportaram efeito significativo de quase -55 Kg de leite para o aumento de 1% no coeficiente de endogamia.

Biffani et al. (2002), ao trabalharem com animais endogâmicos ($F \geq 6,25\%$) em rebanhos da raça Holandesa na Itália, encontraram redução de 21,6; 0,84 e 0,66 Kg para, respectivamente, a produção de leite, gordura e proteína ao aumento de 1% no coeficiente de endogamia.

Autores tem sugerido que a regressão linear pode não ser o melhor modelo para explicar o impacto da endogamia sobre características reprodutivas (GULSIJA; GIANOLA; WEIGEL, 2007; CROQUET et al., 2007), evidenciando a presença de associações não-lineares.

Reis Filho (2006), em estudo sobre a estrutura genética da população da raça Gir no Brasil, reportou efeito negativo do aumento de F sobre a produção de leite, idade ao primeiro parto e duração da lactação. Prata et al. (2014) encontraram aumento de um dia no intervalo de partos devido ao aumento de 1% no coeficiente de endogamia de vacas Gir. Shimbo et al. (2000) analisaram 88.733 dados de desempenho de animais da raça Nelore, indicando efeito negativo da endogamia sobre o peso à desmama, peso ao sobre ano, ganho em peso da desmama ao sobre ano, assim como para a circunferência escrotal.

Estudos considerando o impacto da endogamia sobre a reprodução artificial são bastante raros. Alvarez et al. (2005) estudaram dados de produção de embriões em vacas da raça Mantiqueira, reportando diferenças significativas na produção de embriões de vacas com $F=0\%$ e $F=9\%$. Os autores indicaram a existência de efeito quadrático do coeficiente de endogamia sobre o número de embriões viáveis produzidos. Bezdíček et al. (2014) observaram associação significativa entre o número de embriões degenerados e o aumento do coeficiente de endogamia em vacas da raça Holandesa por meio de múltipla ovulação.

1.1.4 Estimação de parâmetros genéticos para variáveis discretas

Um dos principais objetivos da genética quantitativa aplicada ao melhoramento animal é estimar componentes de (co) variância, assim como valores genéticos para a população estudada (KÖNIG, 2007). Portanto, a adequação dos modelos propostos para análise genética aos dados é de grande importância.

Características de interesse para o melhoramento animal são frequentemente definidas por contagens, as quais assumem distribuições não-contínuas organizadas por categorias ($y_i = 0, 1, 2, \dots, \eta_i$). Diversas estratégias foram aplicadas para a modelagem de variáveis discretas (contagens) na literatura. A transformação logarítmica ($\log_{10}[X + 1]$) da variável é frequentemente aplicada para modelar características de contagem e tem o objetivo de atingir a normalidade de resíduo de forma a permitir a utilização de Modelo Linear Misto (Linear Mixed Model - LMM) sobre uma variável discreta. Tal estratégia foi utilizada por Merton et al. (2009) na análise genética da produção *in vitro* de embriões na raça holandesa. Ayres et al. (2013) também aplicaram transformação logarítmica a contagem de carrapatos em animais da raça Nelore. Apesar deste tipo de variável não apresentar distribuição normal, alguns autores têm utilizado modelos lineares para análise genética de características que assumem variáveis discretas (TONHATI et al., 1999). Mesmo não sendo adequada a modelagem de variáveis não-Gaussianas, a aplicação de LMM para características discretas torna-se uma abordagem interessante, quando se objetiva testar a robustez de diferentes algoritmos ou apenas para quantificar o viés gerado por essas aplicações em problemas de melhoramento animal.

Mais recentemente, dados de contagem foram analisados através de Modelos Lineares Mistos Generalizados (Generalised Linear Mixed Models - GLMMs) assumindo distribuição de Poisson (KÖNIG et al., 2007, VAZQUEZ et al., 2009;2012, AYRES et al., 2012; ABDOLLAHI-ARPANAHI et al., 2013; VENTURA et al., 2015), binomial negativa (TEMPELMAN; GIANOLA, 1999; VARONA; SØRENSEN, 2010) e respectivas distribuições de zero (RODRIGUES-MOTTA et al., 2007; NAYA et al., 2008). A teoria para modelos

lineares mistos generalizados (GLMMs) (MC CULLAGH; NELDER, 1983) foi proposta a partir da percepção que diversas variáveis de interesse seguem distribuição não-Gaussiana. Estes modelos são uma extensão do modelo linear geral e incluem o conceito da “função de ligação”, a qual especifica a relação entre o valor esperado da variável resposta y_i e o preditor linear η_i . A função de ligação “Log”, onde $\eta_i = \log_e(y_i)$, é comumente usada para modelagem de características de contagem.

Apesar das propriedades únicas dos GLMMs, a notação matricial básica não é diferente da adotada em modelos lineares, amplamente, utilizada em melhoramento animal, definido por:

$$y = Xb + Zu + e$$

onde y = vetor de observações que representam uma variável em escala desconhecida e não observável. Este y desconhecido é afetado por efeitos fixos (representados pelo vetor b), efeitos aleatórios de animal (representado pelo vetor u), e o efeito aleatório residual representado por e . As matrizes de incidência dos efeitos fixos e aleatórios são X e Z , respectivamente.

Qualquer que seja a estratégia adotada para modelagem de variáveis discretas, esta é fundada na pré-suposição que, apesar de representada por categorias características de contagem, também são afetadas por diversos genes, e consequentemente, seguem modelo infinitesimal (SCHAEFFER, 2006). Isto demonstra que existe uma variável contínua e normalmente distribuída “oculta” capaz de explicar essas características categóricas.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AYRES, D.R.; PEREIRA, R.J.; BOLIGON, A.A.; SILVA, F.F.; SCHENKEL, F.S.; ROSO, V.M. and ALBUQUERQUE, L.G. Linear and Poisson models for genetic evaluation of tick resistance in cross-bred Hereford x Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 130: 417–424, 2013.

AZEVEDO, D.M.M.R.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.N.B.; MALHADO, C.H.M.; LÔBO, R.B.; MOURA, A.A.A.; PIMENTA FILHO, E.C. Desempenho reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.988-996, 2006

BETTERIDGE, K.J. An historical look at embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, 62:1-13, 1981.

BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, 79:203-244, 2003.

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.

BIFFANI, S.; SAMORÉ A. B.; CANAVESIF. Inbreeding depression for production, reproduction and functional traits in Italian Holstein cattle. Pages 183-186 in Proc. **7th World Congress of Genetic et. Applied to Livestock Production**, Montpellier, France. INRA, Montpellier, France, 2002.

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(1): 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M. A. *In vitro* competence of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, 47: 1061-1075, 1997.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter in cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenolog**, 45:1001-14, 1996.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, 51(1), 59-70, 1999.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; ARAÚJO, M.C.C. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito e espermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:709-715, 2002.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, 85:53-59, 2005.

CAMARGO, L.S.; VIANA, J.H.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, 3(1):19-28, 2006.

CAMARGO, L.S.; FREITAS, C.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, 120:10-15, 2010.

CARVALHO, J.B.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, O.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, 69:852-858, 2008.

CROQUET, C.; MAYERES, P.; GILLON, A.; VANDERICK, S.; GENGLER, N. Inbreeding depression for global and partial economic indexes, production, type, and functional traits. **Journal of Dairy Science**, 89:2257–2267, 2006.

DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.; BOLS, P.E.; GENICOT, G.; HANZEN, C.H. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction Domestic Animals**, 43:239-245, 2008.

FALCONER, D. S., and T. F. C. MACKAY. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4th ed. Addison Wesley Longman, Harlow, UK, 1996.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L; SOLER, J.M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bosindicus*) cattle. **Theriogenology**. 47(8): 1489-1505, 1997.

GAMA FILHO, R.V.; DsC ; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Recuperação de oócitos pela técnica de OPU na produção de embriões in vitro de doadoras da raça Guzerá após tratamento com FSH/GnRH, 2006.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; TORRE, J.R.; SOUZA A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bosindicus* heifers. **Theriogenology**, 69:852-858, 2008.

GROEN, A. F.; STEINE, T.; COLLEAU, J.J.; PEDERSEN, J.; PRIBYL, J.; and REINSCH, N. Economic values in dairy cattle breeding, with special reference to functional traits. Report of an EAAP-working group. **Livestock Production Science**, 49:1–21, 1997.

GULSIJA, D.; GIANOLA, D.; WEIGEL, K.A. Nonparametric analysis of the impact of inbreeding on production in Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, 90(1):493-500, 2007.

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

HINRICHS D.; TALLER, G. Pedigree analysis and inbreeding effects on calving traits in large herds in Germany. **Journal of Dairy Science**, 94:4726–4733, 2011.

IGUMA, L.T.; SALES, J.N.S.; BATISTA, R.I.T.P.; PEREIRA, M.M.; QUINTÃO, C.C.R.; VERNEQUE, R.S.; VIANA, J.H.M.; BARUSELLI, P.S. Evaluation of oocyte quality recovered from Gir breed cows with synchronized follicular wave on *in vitro* embryo production. **Reproduction, Fertility and Development**, 23(1) 213-213, 2010.

JOHANSSON, I.; RENDEL, J. Studies on the variation in dairy traits of intact and split pairs of cattle twins under farm conditions. **Acta Agricola Scandinavica**, 21:89, 1971.

JOSHI, N.R., PHILIPS, R.W. Zebu Cattle of India and Pakistan, **FAO Agriculture Studies**, No. 19, Publ. by FAO, Rome, 256 pp, 1953.

ABDOLAH-ARPANAHI, R.; PEÑAGARICANO, F.; ALILOO, H.; GHIASI, H.; URIOSTE, J.I. Comparison of Poisson, probit and linear models for genetic analysis of number of inseminations to conception and success at first insemination in Iranian Holstein cows. **Livestock Science** 153 (2013) 20–26, 2013.

KÖNIG, S.; BOSSELMAN, F.; VON BORSTEL, U. and SIMIANER, H. Genetic analyses of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90: 3945-3954, 2007.

LAND, R.B.; HILL, W.G. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. **Animal Production**, 21: 1- 12, 1975.

LOHUIS, M.M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, 43: 51-60, 1995.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, 41: 67-72, 1994.

LUSH J.L. **Animal Breeding Plans**. Ames: Iowa State College, 443p, 1945.
FALCONER, D.S. Introduction to Quantitative Genetics. 3th edition. New York, Longman Scientific & Technical, 438p, 1989.

MADALENA, F.E. Animal Breeding and development – South American perspective. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 171–172, 2012.

MAPLETOFT R.J.; HASLER J.F. Assisted Reproductive technologies in cattle: a review. **Reveu Scientifique et Technique**, (OIE), 24(1), 393-403, 2005.

MC CULLAGH, P. and NELDER, J. A.: Generalized linear models. Chapman and Hall London – New York, 261, 1983.

MC PARLAND, 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.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; ULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS P.L.; 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.

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.

MIGLIOR F.; BURNSIDE E.B.; DEKKERS J.C.M. Nonadditive genetic effects and inbreeding depression for somatic cells count in Holstein Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1168-1173, 1995.

NAYA H.; URIOSTE, J.I.; CHANG, Y.; RODRIGUES-MOTTA, M.; KREMER, R.; GIANOLA, D. A comparison between Poisson and zero-inflated Poisson regression models with application number of Black spots in Corriedale sheep. **Genetic Selection Evolution**, 40, 379-394, 2008.

NICHOLAS, F.W. The potential effect of multiple ovulation and embryo transfer on response to selection in dairy cattle. **Proceedings of the 3rd International Congress**, Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania. Animal Breeding Papers, 9-1 to 9-4. SABRAO, Canberra, 1977.

NICHOLAS, F.W. The genetical implications of multiple ovulation and embryo transfer in small dairy herds. **Proceedings of the 30th Annual Meeting EAAP**, Paper CG 1.11. EAAP, Harrogate, 1979.

NICHOLAS, F.W; and Smith, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Production**, 36: 341-353, 1983.

NICHOLAS, F.W. Incorporation of new reproductive technology in genetic improvement programmes. In: W.G. Hill and T.F.C. Mackay (Editors), **Evolution and Animal Breeding**. CAB International, Wallingford, pp. 203-209, 1989.

NICHOLAS, F.W.; Genetic improvement through reproductive technology. **Animal Reproduction Science**, 42. 205-214, 1996.

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, 2000.

PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; PENNA, V.M.; MARTINEZ, M.L. Genetic trends for milk yield in guzerat herds participating in progeny testing and MOET nucleus schemes. **Genetics and Molecular Research**, 5 (3), 454–465, 2006.

PENNA, V.M.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; MELO, M.V.M.; MADALENA, F.E. Utilization of Moet Nucleus in the improvement of Guzerá. **7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, August 19-23, Montpellier, France, 2002.

PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.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**, 71:690-697, 2009.

PONTES, J.H.; SILVA, K.C.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bostaurus*, *Bosindicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, 74:1349-55, 2010.

PRATA, M.A.; PEREIRA, M.C.; L FARO, L.; CARDOSO, V.L.; VERCESI FILHO, A.E.; VERNEQUE, R.S.; BRUNELI, F.A.T.; PEIXOTO, M.G.C.D. Efeito do intervalo de partos sobre a eficiência produtiva e econômica em rebanhos Gir Leiteiro. **Boletim da Indústria Animal**, v.71, n.1, p.1-7, 2014.

QUINN, P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. **Fertility and Sterility**, 81:27-29, 2004.

QUINTON, M.; SMITH, C.; GODDARD, M.E. Comparison of selection methods at the same level of inbreeding. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1060-1067, 1992.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO ANIMAL, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, p.153-160, 2002.

REIS FILHO, J.C. Endogamia na raça Gir. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, UFV. João Cruz Reis Filho, 49f, 2006.

RODRIGUES-MOTTA, M.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; ROSA, G.J.M. and CHANG, Y. M. A Zero-Inflated Poisson Model for Genetic Analysis of the Number of Mastitis Cases in Norwegian Red Cows. **Journal of Dairy Science**, 90:5306–5315, 2007.

RUST, J.M.; VISSER, D.S.; VENTER, J.E.; BOSHOFF, M.P.; FOSS, S.; GREYLING, J.P.C.; The effect of season on aspects of in vitro embryo production in sub-fertile beef cows. **South African Journal of Animal Science**, 39 (Supplement 1), 2009.

SCHAEFFER, L. R. Threshold models. Course notes. Department of Animal Breeding and Poultry Science, University of Guelph, 2006.

SHIMBO, M.V.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; OLIVEIRA, F.F.; JUBILEU, J.S.; FIGUEIREDO L.G.G.; MATTOS, E.C. Efeito da endogamia sobre características de desempenho de bovinos da raça Nelore. In SIMPÓSIO PECUÁRIA 2000 PERSPECTIVAS PARA O III MILÊNIO, 1., Pirassununga, 2000. Anais. Pirassununga: FZEA-USP, CD-ROM, 2000.

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

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VAN DE VELDE, A.; JU J.; SCHREIBER, D.; TIPP, M.W.; LEVINE H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; Yang, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biological of Reproduction**, 62 (1), 206-213, 2000.

TEMPELMAN, T. J.; and GIANOLA, D. Genetic Analysis of Fertility in Dairy Cattle Using Negative Binomial Mixed Models. **Journal of Dairy Science**, 82:1834–1847, 1999.

THIBIER, M. New biotechnologies in cattle production. In: **7 th Congress of the “F. A.V.A.”**, Pattaya (Thailand): 513-524, 1990.

THIBIER M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. **Embryo Transfer Newsletter**, IETS2003:12–9, 2003.

THOMPSON, J.R.; EVERETT, R.W.; HAMMERSCHMIDT, N.L.; Effects of inbreeding on production and survival in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1856-1864, 2000.

TONHATI, H., LÔBO, R.B. and OLIVEIRA, H.N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. **Theriogenology**, 51:1151-1156, 1999.

VAN VLECK, L.D. Potential impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning, and selting in dairy cattle. In: B.G. Brackett, G.E.

Seidel, Jr. and S.M. Seidel (Editors), **New Technologies in Animal Breeding**. Academic Press, New York, pp. 221-242, 1981.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, 65:914-925, 2006.

VARONA, L. and SØRENSEN, D. A Genetic Analysis of Mortality in Pigs. **Genetics**, 184:277–284, 2010.

VAZQUEZ, A.I.; GIANOLA, D.; BATES, D.; WEIGEL, K.A.; HERINGSTAD, B. Assessment of Poisson, logit, and linear models for genetic analysis of clinical mastitis in Norwegian Red cows. **Journal of Dairy Science**, Volume 92, Issue 2, Pages 739-748, 2009.

VAZQUEZ, A.I.; PEREZ-CABAL, M.A.; HERINGSTAD, B.; RODRIGUES-MOTTA, M.; ROSA, G.J.M.; GIANOLA, D.; WEIGEL, K.A. Predictive ability of alternative models for genetic analysis of clinical mastitis. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 129:120–128, 2012.

VENTURA, H.T.; FABYANO, F.S.; VARONA, L.; FIGUEIREDO, E.A.P.; COSTA, E.V.; SILVA, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131500178X>
L.P.; VENTURA, R.; LOPES, P.S. Comparing multi-trait Poisson and Gaussian Bayesian models for genetic evaluation of litter traits in pigs. **Livestock Science**. Volume 176, Pages 47-53, 2015. L.P.; VENTURA, R.; LOPES, P.S. Comparing multi-trait Poisson and Gaussian Bayesian models for genetic evaluation of litter traits in pigs. **Livestock Science**. Volume 176, Pages 47-53, 2015.

VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, 73:966-972, 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**, v.9, n.1, p.12-18, 2012.

WIGGANS, G.R.; VAN RANDEN, P.M.; ZUURBIER, J. Calculation and use of inbreeding coefficients for genetic evaluation of United States dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1584-1590, 1995.

WOOLLIAMS, J.A.; and WILMUT, I. Embryo manipulation in cattle breeding and production. **Animal Production**, 48, pp, 1989.

CAPÍTULO 1. Análise genética da produção de oócitos e embriões de doadoras da raça Guzerá; e sua associação com a idade ao primeiro parto.

B.C. Perez, M.G.C.D. Peixoto, F.A.T. Bruneli, P.V.B. Ramos e J.C.C. Balieiro

¹Programa de Pós Graduação, Qualidade e produtividade animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

²Embrapa Gado de Leite, CNPGL, Juiz de Fora, MG, Brasil

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

⁴Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi estimar componentes de variância para características relacionadas à produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Guzerá e, assim como investigar sua associação com a idade ao primeiro parto (A_{FC}). As características analisadas foram número de oócitos viáveis (N_{OV}), número de oócitos grau I (N_{GI}), número de embriões clivados (N_{CLV}) e embriões viáveis (N_{EMB}) produzidos; e os percentuais de oócitos viáveis (P_{OV}), oócitos grau I (P_{GI}), embriões clivados (P_{CLV}) e embriões viáveis (P_{EMB}). Os dados foram obtidos de 5.173 sessões de punção ovariana, seguidas de fertilização *in vitro* em 1080 fêmeas Guzerá de diferentes idades, ocorridas entre março de 2005 a julho de 2013. As variáveis foram transformadas ($\log_e X+1$), antes da análise. Componentes de (co) variância foram estimados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML), utilizando modelo animal uni e bi característica. O efeito aleatório de ambiente permanente e de reprodutor (pais dos embriões) foram incluídos. As herdabilidades estimadas para N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} , N_{EMB} , P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} , e P_{EMB} foram 0,19; 0,08; 0,16; 0,14; 0,04; 0,03; 0,01; e 0,07, respectivamente. A repetibilidade para características de contagem (N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} e N_{EMB}) variou de 0,14 e 0,32; maiores do que as estimadas para características percentuais (P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB}) a qual variou de 0,01 a 0,08. A seleção para N_{OV} parece mais apropriada à programas de melhoramento do que a seleção para N_{EMB} , por sua alta correlação genética (0,68) com N_{EMB} ,

menor tempo de obtenção e melhor custo-benefício. A_{FC} mostrou-se fracamente associada com características associadas a produção de oócitos e embriões, o que indica que não deve haver efeito sobre A_{FC} quando realizada seleção para tais características.

Palavras chave: análise bivariada; parâmetros genéticos; fertilização *in vitro*; punção ovariana; ambiente permanente; gado zebu

ABSTRACT: The objective of this study was to estimate variance components for oocyte and embryo production traits in Guzerá breed female donors, and investigate their associations with age at first calving (A_{FC}). The traits analyzed were the number of viable oocytes (N_{OV}), the number of grade I oocytes (N_{GI}), the number of cleaved embryos (N_{CLV}) and viable embryos produced (N_{EMB}), and the percentages of viable oocytes (P_{OV}), grade I oocytes (P_{GI}), cleaved embryos (P_{CLV}), and viable embryos (P_{EMB}). Data were obtained from 5173 ovary puncture and *in vitro* fertilization sessions using 1080 Guzerá female donors of different ages, occurred from March 2005 to July 2013. Variables were log-transformed ($\text{Log}_e X+1$) prior to analysis. (Co)Variance components were estimated by restricted maximum likelihood (REML), using one- and two-trait animal models. Permanent environment and IVF sire (father of the embryos) random effects were included. Estimated heritabilities for N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} , N_{EMB} , P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} , and P_{EMB} were 0.19, 0.08, 0.16, 0.14, 0.04, 0.03, 0.01, and 0.07, respectively. Repeatability for count traits (N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} and N_{EMB}) varied from 0.14 and 0.32, higher than estimated for percentage traits (P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} and P_{EMB}) which varied from 0.01 to 0.08. Selection for N_{OV} may be more appropriate in breeding programs than selection for N_{EMB} , because of its strong genetic correlation (0.68) with N_{EMB} and its greater time- and cost-effectiveness. A_{FC} was only weakly associated with the oocyte and embryo production traits, which indicates that there would be no effect on A_{FC} when selecting for these traits.

Key words: bivariate analysis; genetic parameter; *in vitro* fertilization; ovum pick-up; permanent environment; zebu cattle

2.1 INTRODUÇÃO

As tecnologias da reprodução animal têm sido aplicadas de forma bem-sucedida em todo mundo, contribuindo para o aumento da importância de vacas em programas de melhoramento genético (GUERREIRO et al., 2014) e assumindo papel importante no aprimoramento da acurácia e intensidade de seleção para características quantitativas. Aproximadamente 1.275.874 embriões foram produzidos em 2013, 546.628 dos quais foram derivados de produção *in vitro* (IETS, 2014). Neste ano o Brasil foi responsável por 70,8% do total de embriões produzidos *in vitro* no mundo (IETS, 2014). Atualmente, a punção ovariana (OPU) seguida de produção *in vitro* e de embriões são as principais ferramentas para o aumento do número de indivíduos de interesse nos rebanhos zebuínos.

Para o rebanho Guzerá brasileiro, em particular, as biotécnicas reprodutivas assumiram importante papel desde 1994, quando o núcleo de seleção baseado em um programa de transferência de embriões (MOET – Múltipla Ovulação seguida de Transferência de Embriões; NICHOLAS; SMITH, 1983) foi implementado (PENNA et al., 2002). A MOET, e mais recentemente a OPU, seguida de IVEP, têm sido utilizadas no núcleo de forma a acelerar a identificação de indivíduos geneticamente superiores.

Em sistemas tropicais extensivos, nos quais o cruzamento *Bos indicus* x *Bos taurus* é o grupo genético predominante e a manutenção da heterose caracteriza-se como um obstáculo, a IVEP oferece novas possibilidades para elevar a produção em rebanhos comerciais bovinos. O processo de transferência de embriões cruzados (F1) produzidos *in vitro* em fêmeas F1 de forma a implementar a reposição contínua de animais F1 e preservar a máxima heterose em rebanhos comerciais, mostrou-se economicamente viável (RUTHLEDGE, 2004; MADALENA, 2012), aumentando a produção de leite e carne nos trópicos.

Características reprodutivas são complexas, assim como características reprodutivas relacionadas a biotecnologia, considerando que ambas devem compartilhar processos biológicos similares. Estudos anteriores indicaram a nutrição (PONTER et al., 2012; SALES et al., 2015), estresse térmico (TORRES-JÚNIOR et al., 2008; BARUSELLI et al., 2012), qualidade do oócito (MERTON

et al., 2009), fertilização *in vitro* (IVF) (SIMÕES, 2013), intervalo entre sessões, e técnicas de aspiração (MERTON et al., 2003) como alguns dos efeitos que influenciam resultados da IVEP. Componentes genéticos têm apresentado influência sobre o sucesso a tecnologias de MOET (TONHATI et al., 1999; PEIXOTO et al., 2004; KÖNIG et al., 2007) e OPU/IVEP (MACHADO et al., 2006; MERTON et al., 2009). No entanto, a maioria dos estudos investigaram fatores fisiológicos, ambientais e tecnológicos que afetam a produção de embriões bovinos. Num único estudo que considerou a variação genética aditiva em OPU/IVEP, Merton et al. (2009) reportaram herdabilidades de 0,07 a 0,25 na raça holandesa, usando modelos touros. Os autores enfatizaram a importância da produção de embriões na genômica (MERTON et al., 2009). Considerando que, no futuro, a seleção genômica poderá ser conduzida em estágio embrionário, um maior número de embriões produzidos por doadora resultaria em maior capacidade de seleção (KADARMIDEEN et al., 2015).

Pouca atenção tem sido dada aos componentes genéticos envolvidos na produção de óocitos e embriões de doadoras zebuínas submetidas à OPU/IVF. Da mesma forma, estudos que consideram a associação genética entre características reprodutivas naturais e artificiais são escassos. Portanto, para investigar os componentes genéticos e associação entre características relacionadas a IVEP e a reprodução natural foram estimados parâmetros genéticos para características numéricas e percentuais, e sua associação com a idade ao primeiro parto em vacas Guzerá.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Um total de 5.173 aspirações de 1.080 doadoras Guzerá, filhas de 245 touros e 745 vacas, foram analisadas. As sessões foram conduzidas em 16 rebanhos distribuídos nas regiões sudeste, nordeste e centro-oeste do Brasil, realizadas entre março de 2005 e julho de 2013. Os animais tinham entre 1 e 20 anos de idade ao momento da OPU. O arquivo de genealogia, utilizado para determinar o relacionamento genético entre as 1.080 doadoras incluiu ao menos

cinco gerações anteriores. O número de sessões variou de 1 a 49 por doadora, e os intervalos entre sessões de OPU na mesma doadora variaram entre 7 e 120 dias. Um total de 147 touros foram utilizados na IVF.

2.2.2 Procedimentos de punção ovariana e produção *in vitro* de embriões

As estruturas foram obtidas pelo método de punção ovariana guiada por ultrassom descrita por Seneda (2001), seguida de IVF um dia após a aspiração. As sessões de OPU foram realizadas por técnicos utilizando equipamento de ultrassom Mindray DP-2200 (Mindray, Shenzhen, China), com transdutor convexo 6,5-MHz conectado a um guia de punção WTA® puncture guide (WTA, Cravinhos, SP, Brazil) e cateteres 18G (JELCO® PLUS, Medex do Brasil, SP, Brazil). Imediatamente após a OPU, tubos contendo estruturas coletadas das doadoras foram levadas ao laboratório da fazenda em tubos Falcon™ de 50mL (Corning® Glass Works, Corning, NY, USA), passados através de filtro EmCom com tampão salino fosfatado (Phosphate buffered saline, PBS-Nutricell, Campinas, Brazil), e lavado três vezes em placa de Petri com a mesma solução utilizada no procedimento de OPU.

A seleção, contagem e classificação foi conduzida considerando o número de células do *cumulus*, citoplasma das células do *cumulus* do oócito (graus I, II, e III), o número de células sem *cumulus*, e o número de células expandidas, atresicas e degeneradas, como descrito por Lonergan (1992). Os oócitos considerados viáveis (Graus I, II e II) foram lavados em TCM-199 Hepes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) e suplementados com soro fetal bovino a 10%, 50 µg de gentamicina e 2,2 µg de piruvato. Os oócitos foram transferidos para criotubos (Uniscience São Paulo, Brasil) com 400µL meios de maturação, constituído com bicarbonato TCM-199 (Thermo Fischer Scientific), suplementado com soro fetal bovino a 10%, 50 IU hCG/mL, 0,5 µg/mL hormônio folículo estimulante, 1 µg/mL estradiol, 2,2 µg/mL de piruvato e 70 µg/mL amikacin. O meio foi coberto com 300 µL de óleo mineral a 5% CO₂ de forma a transportá-lo em incubador portátil a 38,5°C.

No laboratório os oócitos em maturação foram transferidos para placas de Petri (100 × 20 mm; TPP, Vitrocell, Campinas, Brazil) em microgotas de 100-µL

de meio de maturação (similar ao meio de transporte). Os oócitos foram incubados por 24 horas a 38,5°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após a maturação os oócitos foram lavados com meio de fertilização (Tyrode's albumin lactate pyruvate, TALP-IVF). Foram utilizadas microgotas (100 µL) de TALP suplementadas com 10 µg/mL de heparina, e 160 µL de penicilamina-hipotaurine-epinefrina.

O sêmen utilizado na IVF foi separado em Percoll 90, 45% e centrifugado ($200 \times g$) por 30 min, sendo antes ajustado para obter a concentração final de 100×10^3 de espermatozoide viáveis por gota. AIVF foi conduzida por 18 horas a 39°C em atmosfera de 5% CO₂. Após a fertilização as estruturas foram lavadas em 100 µL em meio sintético modificado (synthetic oviduct fluid - SOF) e coberto com óleo mineral. O meio de cultura foi renovado para cada micro gota após 3 e 5 dias (Feeding), e após seis dias foram levados a fazenda de forma a transferir os embriões para as receptoras.

2.2.3 Estimação de parâmetros genéticos

Foram analisados o número de oócitos viáveis (N_{OV}), o número de oócitos grau I (N_{GI}), o número de embriões clivados (N_{CLV}) e embriões viáveis (N_{EMB}) produzidos; e os percentuais de oócitos viáveis (P_{OV}), oócitos grau I (P_{GI}), embriões clivados (P_{CLV}) e embriões viáveis (P_{EMB}). Características percentuais (P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB}) foram calculadas como proporções de N_{OV} , exceto por P_{OV} , que foi calculado como proporção do total de oócitos produzidos. Transformação logarítmica ($\log_e[x + 1]$) foi aplicada a todas as variáveis (exceto P_{OV}) para se obter uma distribuição normal e estimar os componentes de variância. P_{OV} apresentou uma distribuição próxima à Gaussiana. Os componentes de variância foram estimados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML), utilizando o software ASREML (GILMOUR et al., 2002) sob modelo animal. Estimativas dos componentes de variância foram obtidos através de análises univariadas e covariâncias foram obtidas em análises bivariadas. Valores de herdabilidade obtidos à análise univariada não diferiram de forma significativa dos obtidos através de análises bivariadas.

Os modelos propostos foram:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + e_{ijklmn} \quad (1)$$

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + IVFbull_p + e_{ijklmn} \quad (2)$$

onde y_{ijklmn} representa as características estudadas; μ é o intercepto; hy_i é o efeito fixo de rebanho-ano da OPU ($i=1,2,\dots,84$); bh_j é o efeito fixo do rebanho de nascimento da doadora ($j=1,2,\dots,16$); $season_k$ é a estação da OPU ($k=1$ or 2); $intOPU_l$ é o efeito fixo das classes de intervalo entre as sessões de OPU ($i=1,2,\dots,6$); $tech_m$ é o efeito fixo do técnico responsável pela OPU ($m=1,2,\dots,7$); βAge e $\beta_2 Age$ representam a idade da doadora à OPU (em meses) como covariável (efeitos linear e quadrático, respectivamente); pe_{ijklm} é o efeito aleatório de ambiente permanente ($o=1,2,\dots,1080$); $IVFbull_p$ é o efeito aleatório do touro usado na IVF ($p=1,2,\dots,147$); e e_{ijklmn} representa é o efeito aleatório residual. Ambos os modelos incluíram o efeito aleatório de animal ($animal_n$) de forma a estimar o componente genético aditivo.

O modelo 1 foi utilizado para descrever características relacionadas a produção de oócitos (NOV , POV , NGI e P_{GI}) e o modelo 2 para características relacionadas à produção de embriões (N_{CLV} , P_{CLV} , N_{EMB} e P_{EMB}). O segundo modelo é idêntico ao primeiro, apenas incluindo o efeito de touro ($IVFbull_p$).

Para a análise da idade ao primeiro parto (A_{FC}), dados de 3.194 vacas Guzerá foram analisados; A_{FC} variou entre 660 a 1.458 dias. O modelo animal univariado incluiu efeitos fixos de rebanho-ano de nascimento da vaca e a estação de parto, além dos efeitos aleatórios de animal e residual.

A associação entre características relacionadas à OPU/IVEP e A_{FC} foram analisadas através da correlação de Pearson ($\rho_{x,y}$) entre os valores genéticos estimados para características reprodutivas naturais e artificiais. Dos 6.850 animais no arquivo de genealogia, os 30% ($n=2,055$) valores genéticos

estimados (para ambas as características) mais acurados foram usados para análise empírica de associação.

2.3 RESULTADOS

A Tabela 1.1 apresenta a estatística descritiva dos dados obtidos. No geral, as características analisadas apresentaram valores altos para o coeficiente de variação (CV). N_{GI} e P_{GI} apresentaram os maiores valores de CV para, respectivamente, grupos de contagem e percentuais, enquanto P_{OV} demonstrou a menor variação entre as características estudadas. Quando comparadas as amplitudes das variáveis de contagem (N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} , N_{EMB}), os valores das mediana sugerem que estas características seguem distribuição não-Gaussiana com valores extremos.

Tabela 1.1 Número de observações (N), medianas, médias, desvios padrão (SD), coeficientes de variação (CV), e amplitudes das características analisadas (variáveis não transformadas).

Item	N	Mediana	Média	SD	CV (%)	Amplitude
N_{OV}	5.173	11,00	15,19	12,71	83,67	0–94
N_{GI}	5.173	2,00	3,32	3,61	100,09	0–40
N_{CLV}	5.173	8,00	11,91	10,04	84,29	0–71
N_{EMB}	5.173	4,00	5,96	5,68	95,30	0–48
P_{OV}	5.173	55,00%	58,99%	14,71%	24,93	0–100%
P_{GI}	5.173	20,00%	22,57%	18,94%	83,91	0–100%
P_{CLV}	5.173	68,50%	65,50%	19,52%	29,80	0–100%
P_{EMB}	5.173	33,33%	34,73%	20,23%	58,25	0–100%

N_{OV} , número de oócitos viáveis; N_{GI} , número de oócitos grau I; N_{CLV} , número de embriões clivados; N_{EMB} , número de embriões viáveis; P_{OV} , percentual de oócitos viáveis; P_{GI} , percentual de oócitos de grau I; P_{CLV} , percentual de embriões clivados; P_{EMB} , percentual de embriões viáveis.

Os parâmetros genéticos obtidos à análise univariada das características relacionadas a oócitos e embriões são apresentados na Tabela 1.2. As variâncias genéticas (σ^2_a) para características de contagem foram proporcionalmente maiores (em relação a σ^2_e) do que as estimadas para características percentuais. O mesmo ocorreu para o componente de ambiente (σ^2_{pe}). N_{OV} apresentou a maior repetibilidade (0,32), seguido por N_{CLV} (0,27) e

N_{EMB} (0,21). Todas as variáveis percentuais (P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB}) tiveram baixa repetibilidade, variando entre 0,01 a 0,08. A proporção do total da variação referente ao efeito de touro (usado na IVF) (b^2) para N_{EMB} (Tabela 2) foi de 1,1%; 4,8%; 4,7% e 9,5% respectivamente para N_{CLV} , N_{EMB} , P_{CLV} e P_{EMB} . Para P_{CLV} e P_{EMB} em particular, o efeito de touro representou mais do total da variação do que o componente genético aditivo. Portanto, o aprimoramento da fertilidade do macho utilizado na biotecnologia *in vitro* pode ser uma ferramenta eficaz no aumento do percentual de embriões na raça Guzerá.

Tabela 1.2 Estimativas de variância ambiental (σ^2_e), variância genética aditiva (σ^2_a), variância de ambiente permanente (σ^2_{pe}), variância fenotípica (σ^2_p), variância do efeito de touro (sêmen usado na fertilização *in vitro*) (σ^2_b), proporção do total da variância referente ao efeito de touro (b^2), e repetibilidade (r) das variáveis estudadas (transformada e não transformada).

Item	σ^2_e	σ^2_a	σ^2_{pe}	σ^2_p	σ^2_b	b^2	r
N_{OV}	0.2538	0.1026	0.1685	0.5249	-	-	0.321
N_{GI}	0.4384	0.0446	0.0809	0.5640	-	-	0.143
N_{CLV}	0.2778	0.0776	0.1362	0.4974	0.00574	0.011	0.273
N_{EMB}	0.3046	0.0728	0.1065	0.5084	0.02443	0.048	0.209
P_{OV}^*	197.8740	7.8983	1.6124	207.3800	-	-	0.080
P_{GI}	0.3470	0.0129	0.0264	0.3864	-	-	0.068
P_{CLV}	0.1189	0.0019	0.0019	0.1288	0.0061	0.047	0.015
P_{EMB}	0.3117	0.0273	0.0304	0.4082	0.0388	0.095	0.074

*Variável não transformada ($\log_e X + 1$).

N_{OV} , número de oócitos viáveis; N_{GI} , número de oócitos grau I; N_{CLV} , número de embriões clivados; N_{EMB} , número de embriões viáveis; P_{OV} , percentual de oócitos viáveis; P_{GI} , percentual de oócitos de grau I; P_{CLV} , percentual de embriões clivados; P_{EMB} , percentual de embriões viáveis.

A Tabela 1.3 apresenta as estimativas de herdabilidade (na diagonal, em negrito), correlações genéticas (abaixo da diagonal), e correlações fenotípicas (acima da diagonal) para as características analisadas. Herdabilidades para as características relacionada à produção de oócitos/embriões variou entre 0,08 (N_{GI}) a 0,19 (N_{OV}), enquanto as herdabilidades para características percentuais foram baixas, variando de 0,01 (P_{CLV}) a 0,07 (P_{EMB}).

As herdabilidades para N_{OV} e N_{EMB} , características fortemente relacionadas ao sucesso à IVEP, foram de baixas a moderadas ($0,19 \pm 0,05$ e $0,14 \pm 0,04$,

respectivamente). A correlação genética entre N_{OV} e N_{EMB} foi moderada à alta (0,68). No entanto, associações negativas foram encontradas entre N_{OV} e todas as variáveis percentuais (P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB}), exceto para P_{OV} . P_{CLV} apresentou componente genético bastante reduzido (0,01).

Tabela 1.3 Estimativas de herdabilidade (diagonal), correlações genéticas (abaixo da diagonal), e correlações fenotípicas (acima da diagonal) das variáveis analisadas e seus erros-padrão associados (entre parênteses).

Item	N_{OV}	N_{GI}	N_{CLV}	N_{EMB}	P_{OV}	P_{GI}	P_{CLV}	P_{EMB}
N_{OV}	0,19 (0,05)	0,64(0,01)	0,90(0,01)	0,72(0,01)	0,35(0,01)	-0,40(0,02)	-0,09(0,01)	-0,20(0,01)
N_{GI}	0,96(0,03)	0,08 (0,03)	0,63(0,01)	0,50(0,01)	0,24(0,01)	0,61(0,02)	-0,04(0,01)	-0,07(0,01)
N_{CLV}	0,88(0,01)	0,98(0,01)	0,16 (0,04)	0,79(0,01)	0,27(0,01)	-0,34(0,01)	0,28(0,01)	-0,02(0,02)
N_{EMB}	0,68(0,05)	0,89(0,07)	0,87(0,05)	0,14 (0,04)	0,24(0,01)	-0,22(0,01)	0,30(0,01)	0,54(0,01)
P_{OV}	0,40(0,18)	0,51(0,21)	0,41(0,21)	0,33(0,22)	0,04 (0,02)	-0,11(0,01)	0,09(0,01)	0,01(0,01)
P_{GI}	-0,22(0,16)	-0,56(0,25)	-0,68(0,22)	-0,75(0,18)	-0,51(0,24)	0,03 (0,02)	0,06(0,01)	0,14(0,01)
P_{CLV}	-0,52(0,25)	-0,52(0,25)	-0,41(0,25)	-0,45(0,25)	0,36(0,25)	0,30(0,28)	0,01 (0,01)	0,46(0,01)
P_{EMB}	-0,36(0,17)	-0,28(0,19)	-0,34(0,21)	0,23(0,21)	0,15(0,20)	0,12(0,23)	0,38(0,26)	0,07 (0,03)

N_{OV} , número de óocitos viáveis; N_{GI} , número de óocitos grau I; N_{CLV} , número de embriões clivados; N_{EMB} , número de embriões viáveis; P_{OV} , percentual de óocitos viáveis; P_{GI} , percentual de óocitos de grau I; P_{CLV} , percentual de embriões clivados; P_{EMB} , percentual de embriões viáveis.

A Tabela 1.4 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os 30% (2055 indivíduos) valores genéticos estimados de maior acurácia (que tinham conexões genealógicas com ambas as reproduções natural e artificial) inclusos no arquivo de genealogia uado na análise de A_{FC} e características da produção *in vitro* de embriões.

Houve apenas uma fraca associação entre as características relacionadas à produção de embriões e A_{FC} na raça Guzerá, que variou entre -0,003 (N_{OV}) e 0,107 (P_{GI}).

Tabela 1.4 Coeficientes de correlação de Pearson ($\rho_{x,y}$) entre os valores genéticos estimados para a idade ao primeiro parto (A_{FC}) e a variáveis relacionadas à produção de embriões na população estudada (n=2055).

Item	N _{OV}	N _{GI}	N _{CLV}	N _{EMB}	P _{OV}	P _{GI}	P _{CLIV}	P _{EMB}
A_{FC}	-0.003	0.008	0.021	-0.006	0.091	0.107	0.013	-0.012

N_{OV}, número de oócitos viáveis; N_{GI}, número de oócitos grau I; N_{CLV}, número de embriões clivados; N_{EMB}, número de embriões viáveis; P_{OV}, percentual de oócitos viáveis; P_{GI}, percentual de oócitos de grau I; P_{CLV}, percentual de embriões clivados; P_{EMB}, percentual de embriões viáveis.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Punção ovariana e produção *in vitro* de embriões

Pontes et al. (2010, 2011) reportaram valores de $23,4 \pm 0,7$, $12,1 \pm 3,9$; e $8,0 \pm 2,7$ para o número de oócitos viáveis obtidos por sessão em animais das raças Nelore, Gir e Holandesa, respectivamente. Os altos valores obtidos para as raças Nelore e Guzerá (neste estudo) podem estar associados com a seleção para características reprodutivas. A seleção para um melhor desempenho reprodutivo pode indiretamente selecionar animais para maior produção de oócitos e embriões. Em animais *B. taurus*, Merton et al. (2009) reportaram medias de 7,8; 4,4; e 1,8 para o número de oócitos viáveis, o número de embriões clivados, e o número de embriões produzidos, respectivamente, e percentuais médios de 26,6; 53,6; e 22,4% para oócitos de grau I, embriões clivados, e embriões produzidos (como proporções do número de oócitos viáveis), respectivamente. Os resultados do presente estudo indicam que a produção de oócitos e embriões na raça Guzerá difere bastante da produção de raças taurinas, como também reportado por Carvalho et al. (2008) em animais zebuínos, particularmente quando consideradas características de contagem (N_{OV}, N_{GI}, N_{CLV} e N_{EMB}).

2.4.2 Herdabilidades para características relacionadas à produção in vitro de embriões

Em geral, as características de contagem (N_{OV} , N_{GI} , N_{CLV} e N_{EMB}) exibiram maior repetibilidade do que características percentuais (P_{OV} , P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB}). Portanto, seria possível categorizar as doadoras após a primeira coleta pelo número de oócitos produzidos, de forma a facilitar o manejo dentro do laboratório, ou até mesmo para identificar doadoras que terão um desempenho bom ou deficiente na resposta à OPU/IVFP.

O componente genético reportado para as variáveis percentuais estudadas sugere que a seleção para maiores percentuais de oócitos/embriões por OPU/IVF pode não ser tão bem-sucedida quanto a seleção para as características de contagem. Isto indica que o aprimoramento de aspectos tecnológicos e ambientais pode ser mais viável para elevar as proporções de oócitos/embriões viáveis por sessão.

Merton et al. (2009) reportaram herdabilidades de $0,25 \pm 0,06$; $0,19 \pm 0,04$; e $0,21 \pm 0,04$ para o número de oócitos viáveis, o número de embriões clivados e o total de embriões produzidos, respectivamente, obtidas para doadoras da raça Holandesa por meio de análise univariada sob modelo touro. Herdabilidades reportadas no presente estudo seguiram um padrão similar. Menores valores de herdabilidade (quando comparados aos valores encontrados no estudo anterior) possivelmente ocorreram pelo fato de Merton et al. (2009) ter utilizado modelo touro, o qual é frequentemente reportado por superestimar o componente genético aditivo em alguns casos.

Correlações genéticas para N_{OV} em relação a N_{EMB} (0,68) e P_{EMB} (-0,36) segurem que a seleção para N_{OV} podem aumentar o total de embriões produzidos, porém diminuirão o percentual de embriões viáveis (como proporção do número de oócitos em cultura). Ambas correlações genética e fenotípica para P_{GI} foram negativas, exceto em relação a P_{CLV} e P_{EMB} , indicando uma importante associação entre a qualidade do oócito e o sucesso à IVEP.

Os resultados do presente estudo indicam que a capacidade dos embriões de atingir o estágio de clivagem em animais *B. indicus* é pouco responsiva à seleção.

As correlações genéticas entre características relacionadas a produção de embriões e a reprodução natural sugerem que a seleção para produção *in vitro* de embriões provavelmente não afetará a idade ao primeiro parto. Além disso, isso pode indicar pouca associação linear entre o sucesso à reprodução artificial (OPU/IVF) e a precocidade na raça Guzerá. Merton et al. (2009) também reportaram uma fraca associação entre características relacionadas a produção *in vitro* de embriões e os índices reprodutivos das filhas dos touros (da raça Holandesa) avaliados.

Baruselli et al. (2014) não encontraram efeito do número de folículos antrais (no estro) sobre taxas de prenhes em vacas da raça Nelore. Considerando que o número de folículos antrais presentes nos ovários está relacionado ao número de oócitos obtidos à OPU, a pouca associação entre essas características reforça a ideia de que entre a reprodução natural e artificial pode existir uma relação complexa e/ou indireta; portanto, a produção de oócitos e embriões podem não ser os indicadores ideais do desempenho reprodutivo de vacas. No entanto, esse resultado também sugere que não serão esperados resultados indesejáveis para a idade ao primeiro parto ao realizar a seleção para produção *in vitro* de embriões.

2.5 CONCLUSÃO

No geral, resultados deste estudo sugerem que a seleção para a eficiência à IVEP pode ser aplicada na raça Guzerá devido à quantidade de variação genética encontrada nas características analisadas. N_{OV} parece responder bem à seleção, aumentando indiretamente o número total de embriões produzidos devido à sua moderada herdabilidade e associação positiva com N_{EMB} . A seleção direta para N_{EMB} poderia também ser aplicada, porém requeria mais tempo para aquisição dos dados e, conseqüentemente, um maior custo. O percentual do total da variação referente ao efeito de touro sobre N_{CLV} , N_{EMB} , P_{CLV} , e P_{EMB} indica a importância da fertilidade do macho para a produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. Estudos futuros poderiam investigar os componentes genéticos para características relacionadas a produção de embriões e sua performance à IVEP.

Apenas uma fraca associação foi encontrada entre os valores genéticos estimados para A_{FC} e das características relacionadas a produção *in vitro* de embriões. O coeficiente de correlação de Pearson obtido entre A_{FC} e N_{OV} reforça que a seleção para N_{OV} seria a mais indicada para aprimorar os resultados de OPU/IVEP na raça Guzerá, assim como parece não haver efeito da seleção para N_{OV} sobre o potencial genético da população para A_{FC}.

2.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

BARUSELLI, O.S.; SÁ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, 47(Suppl. 4): 134-141, 2012.

BARUSELLI, P.S.; VIEIRA, L.M.; GUERREIRO, B.M.; SOARES, J.G.; et al. Relationship between antral follicle population and pregnancy results following fixed-time AI in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Proceedings of the 28th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, Natal, RN, Brazil, 2014.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; Reis, E.L.; NICHIM, M.; et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology** 69: 167-175, 2008.

TORRES-JUNIOR J.R.S.; PIRES M.F.A.; SÁ W.F.; FERREIRA, A.M.; et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, 69: 155-166, 2008.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.J.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.; et al. ASReml User Guide Release 1.0. VSN International Ltd, 2002.

GUERREIRO, B.M.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, 49: 96-104, 2014.

IETS (International Embryo Transfer Society) Data Retrieval Committee. Statistics of embryo collection in farm animals. www.iets.org, 2014. Accessed June 10, 2015.

KADARMIDEEN, H.N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y.F.; STRØBECH, L.; et al. Genomic selection of *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos

for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**, 12: 389-396, 2015.

KÖNIG, S.; BOSSELMAN, F.; VON BORSTEL, U. and SIMIANER, H. Genetic analyses of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90: 3945-3954, 2007.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and cultivation of bovine follicular oocytes. Doctoral thesis, National University of Ireland, 1992.

MACHADO, S.A.; REICHENBACH, H.D.; WEPPERT, M.; WOLF, E.; et al. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**, 65: 573-583, 2006.

MADALENA, F.E. Animal breeding and development- South American perspective. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 129: 171-172, 2012.

MERTON, J.S.; ASK, B.; ONKUNDI, D.C.; MULLAART, E.; et al. 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.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, 59: 651-674, 2003.

NICHOLAS, F.W. and SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Production**, 36: 341-353, 1983.

PEIXOTO, M.G.; PEREIRA, C.S.; BERGMANN, J.A.; PENNA, V.M.; et al. Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nelore females. **Theriogenology**, 62: 1459-1464, 2004.

PENNA, V.M.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; MELO, M.V.M.; et al. Utilization of Moet Nucleus in the improvement of Guzerá. **7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Montpellier, France, 2002.

PONTER, A.A.; GUYADER-JOLY, C.; NUTTINCK, F.; GRIMARD, B. et al. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, 78: 632-645, 2012.

PONTES, J.H.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; et al. 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.

PONTES, J.H.; SILVA, K.C.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and

indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, 74: 1349-1355, 2010.

RAMOS, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Fecundação in vitro com sêmen de bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 52: 360-365, 2000.

RUTLEDGE, J.J. Technology innovations to enhance livestock agribusiness. **Wartazoa**, 14: 58-60, 2004.

SENEDA, M.M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vitro de ovócitos bovinos. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil, 2001.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.B.; SIQUEIRA, A.F.P.; NICHI, M. et al. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction**, 146: 433-441, 2013.

TONHATI, H.; LÔBO, R.B. and OLIVEIRA, H.N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. **Theriogenology**, 51: 1151-1156, 1999.

CAPÍTULO 2. Aspectos genéticos da produção *in vitro* de embriões em rebanhos da raça Guzerá no Brasil.

B.C. Perez¹, M.G.C.D. Peixoto³, F.A.T. Bruneli³, G.G. Santos³, M.A.Pereira⁴, , e J.C.C. Balieiro²

¹Programa de Pós Graduação – Qualidade e produtividade animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

²Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³Embrapa Gado de Leite, CNPGL, Juiz de Fora, MG, Brasil

⁴Associação Brasileira dos Criados de Zebu. ABCZ, Uberaba, MG, Brasil

RESUMO. O objetivo deste estudo foi verificar as tendências genéticas para a idade ao primeiro parto e produção de leite em 305 dias, assim como os níveis de endogamia em uma população de 6.850 bovinos da raça Guzerá no Brasil (T_{POP}); e comparar aos mesmos parâmetros estimados para duas subpopulações derivadas da mesma: doadoras submetidas à punção ovariana (D_{POP} , $N = 1.205$) e embriões produzidos *in vitro* (E_{POP} , $N = 34.696$) no intervalo entre os anos de 2003 e 2013. Os valores genéticos e coeficientes de endogamia estimados foram regredidos pelo ano de nascimento do animal (ou ano da fertilização *in vitro* do embrião) de forma a obter as tendências anuais para estes parâmetros separadamente para cada população estudada. Os coeficientes de endogamia para T_{POP} não apresentaram valores alarmantes, porém, um efeito quadrático positivo ($\beta_2 = 0,00766$) foi detectado. Ambas D_{POP} e E_{POP} apresentaram coeficientes lineares positivos. Os coeficientes de regressão (β_1) foram, respectivamente, 0,0814 ($P < 0,001$) e 0,0266 ($P > 0,05$). As medias anuais dos coeficientes de endogamia para E_{POP} foram maiores do que para T_{POP} e D_{POP} através de período de tempo estudado. A frequência de indivíduos com coeficiente de endogamia maiores que 7% foi maior para D_{POP} . As tendências genéticas para a idade ao primeiro parto (A_{FC}) foram -0,123 dias/ano ($P > 0,05$); -0,431 dias/ano ($P < 0,05$) e -1,45 dias/ano ($P < 0,05$), respectivamente para T_{POP} ; D_{POP} e E_{POP} . Tendências genéticas para a produção de leite (PL_{305}) foram +6,63 Kg/ano ($P < 0,001$); +8,02 Kg/ano ($P < 0,05$) e +10,40 Kg/ano ($P < 0,05$), respectivamente para T_{POP} ; D_{POP} e E_{POP} . Para ambas as características

avaliadas, E_{POP} apresentou coeficientes de regressão mais favoráveis, os quais confirmam o resultado de uma pressão de seleção superior e intervalo de gerações menor que são inerentes a essa população. Os resultados reportados no presente estudo sugerem que o coeficiente de endogamia apresentou aumento para a população Guzerá de duplo propósito. Esforços para controlar a ocorrência de acasalamentos endogâmicos à fertilização *in vitro* deveriam ser considerados para o futuro, uma vez que um possível efeito de gargalo parece estar se formando em D_{POP} e E_{POP}. Em geral, as tendências genéticas e medias anuais foram favoráveis para ambas as características analisadas, confirmando a superioridade genética da população de doadoras Guzerá em relação à população geral.

Palavras chave: tendência genética; endogamia; fertilização *in-vitro*; punção ovariana; zebuínos.

ABSTRACT. The objective of this study was to verify genetic trends for productive and reproductive traits and levels of inbreeding practiced in the Brazilian dual-purpose Guzerá population (T_{POP}); and compare it to the same parameters estimated for two subpopulations derived from that: female donors submitted to ovum-pick up (D_{POP}) and *in vitro* embryos produced (E_{POP}) between 2003 and 2013. Estimated breeding values and inbreeding coefficients were regressed by the animal's (or embryo's) year of birth (or year of *in vitro* fertilization) in order to obtain annual trends for these parameters separately for each of the three populations studied. Inbreeding coefficients for T_{POP} presented no alarming values, but a positive quadratic ($\beta_2 = 0.00766$) effect was detected. Both D_{POP} and E_{POP} showed positive linear coefficients. Regression coefficients (β_1) were respectively, 0.0814 (P<0.001) and 0.0266 (P>0.05). Annual mean inbreeding coefficients for E_{POP} were higher than T_{POP} and D_{POP} through all the time series studied. The frequency of individuals with more than 7% inbreeding coefficient was higher in D_{POP}. Genetic trends for A_{FC} were -0.123 days/year (P>0.05); -0.431 days/year (P<0.05) and -1.45 days/year (P<0.05), respectively for T_{POP}; D_{POP} and E_{POP}. Genetic trends for PL₃₀₅ were +6.63 Kg/year (P<0.001); +8.02 Kg/year (P<0.05) and +10.40 Kg/year (P<0.05), respectively for T_{POP}; D_{POP}

and E_{POP} . For both traits analyzed, E_{POP} showed the highest regression coefficients, which confirms the result of higher selection pressure and lower generation intervals that are inherent of this subpopulation. Results reported in the present study suggest that inbreeding coefficient is increasing in the Guzará population. Efforts for controlling inbred mating on *in vitro* fertilization should be considered, as the presence of a bottleneck effect seems to be getting shape on D_{POP} and E_{POP} . Overall, genetic trends and annual means were favorable for both traits analyzed, confirming the genetic superiority of donor cows when compared to the rest of the population analyzed.

Key words: genetic trends; inbreeding; *in-vitro* fertilization; ovum-pick up; zebu cattle.

3.1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias de reprodução assistida (ART) aplicadas à populações bovinas estão bem estabelecidas tendo alcançado 1.275.874 embriões produzidos mundialmente, no ano de 2013 (IETS, 2014). Dentre essas tecnologias, especificamente a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) e a punção ovariana seguida de fertilização *in vitro* (OPU/IVF) são reconhecidas como importantes ferramentas para promover o aumento do ganho genético através de linhagens maternas, sendo tão importante para a intensidade de seleção das fêmeas quanto a inseminação artificial foi para os machos (NICHOLAS, 1996; MANIK et al., 2003).

A técnica de MOET foi introduzida em 1950 (HASLER, 2003), baseada na produção *in vivo* de embriões mediante superovulação de doadoras bovinas, sendo ainda amplamente utilizada como ferramenta para aumentar o número de descendentes de animais de alto mérito genético, especialmente em raças *Bos taurus*. Em meados do ano 2000, a OPU/IVF emergiu como uma alternativa à MOET, e desde então tem assumido relevância, particularmente nas Américas do Norte e do Sul (VIANA et al. 2012; STROEBECH et al., 2015). No Brasil, especificamente, a produção *in vitro* de embriões cresceu mais de 700% entre 2000 e 2014 (KADARMIDEEN et al., 2015), principalmente devido ao

surpreendente sucesso à essa biotécnica em fêmeas *Bos indicus* e cruzamentos *B. indicus* x *B. taurus* (PONTES et al., 2010; VIANA et al., 2010), os quais são grupo genéticos predominantes nos rebanhos bovinos brasileiros.

As aplicações de MOET e OPU/IVF no melhoramento animal foram bastante discutidas na literatura (NICHOLAS; SMITH, 1983; LOHUIS, 1995; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006; KÖNIG et al. 2007). No geral, existe a concordância de que as ART podem aprimorar o ganho genético anual quando aplicadas corretamente em programas de melhoramento bovino.

A raça Guzera, originária da Índia, é conhecida por sua tolerância ao calor, capacidade de consumo de forragem de baixo valor nutricional e pronunciada resistência a endo e ecto parasitos (PEIXOTO et al., 2010). A raça assume um papel relevante principalmente na região nordeste do Brasil, onde a adversidade ambiental é prevalente. Além disso, animais Guzera são considerados de duplo propósito (PENNA et al., 2002) e têm sido selecionados para leite, carne ou para ambas as aptidões em território nacional (PEIXOTO et al., 2010). Em 1993, um programa de melhoramento nacional, focando nas características de corte, foi implementado para a raça Guzera e, independentemente, em 1994, para produção de leite. A seleção para produção de leite tem se baseado em um esquema de núcleo MOET de seleção e no teste de progênie (NICHOLAS; SMITH, 1983; PENNA et al., 1998; PEIXOTO et al., 2009), ambos desenvolvidos concomitantemente. Apesar dos programas citados serem conduzidos de forma independente, seus bancos de dados são geneticamente conectados (BRUNELLI, 2015), uma vez que diversos rebanhos fazem uso (de sêmen) tanto de touros selecionados para leite, como selecionados para corte em seus acasalamentos.

Apesar da popularidade da OPU/IVEP e seu pronunciado sucesso em rebanhos zebuínos no Brasil, depender de tais tecnologias para acelerar o progresso genético traz discussões acerca da diversidade genética presente na população Guzera em território nacional (PEIXOTO et al., 2010).

A multiplicação de um número reduzido de indivíduos poderia causar diminuição no tamanho efetivo da população; aumentando, consequentemente, o risco de perda de variabilidade genética (VIEIRA et al., 2005; HINRICH; TALLER, 2011). A manutenção de uma variabilidade genética mínima é

necessária para garantir que as gerações futuras sejam capazes de defrontar e se adaptar aos desafios futuros propostos pelas pressões de ambiente e seleção (VAN WYK et al., 2009).

Peixoto et al. (2006) mencionaram a importância da implementação de estratégias para monitoramento da diversidade em programas de melhoramento de raças zebuínas, utilizando metodologias e ferramentas que maximizem o ganho genético, minimizando os efeitos da diminuição da variação genética. Uma vez que a OPU/IVF se tornou uma ferramenta para o aumento do ganho genético e diminuição do intervalo de gerações, esta deveria ser monitorada de forma contínua nos programas de melhoramento animal, pois tem a capacidade de alterar a estrutura genética da população. A tecnologia de IVEP, em teoria, deve ser aplicada principalmente à animais de elevado mérito genético (BARUSELLI et al., 2015). Porém, estudos que verifiquem se as biotécnicas reprodutivas estão sendo aplicadas em populações bovinas zebuínas de forma adequada são, ao nosso conhecimento, inexistentes.

Além disso, existem questões acerca da OPU/IVEP estar indiretamente selecionando fêmeas zebuínas (doadoras) pelo sucesso à esta biotécnica, uma vez que tais procedimentos são, atualmente, adotados em larga escala.

Portanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar as tendências genéticas para características produtivas e reprodutivas, assim como do coeficiente de endogamia em doadoras Guzerá submetidas à OPU/IVEP (e dos embriões produzidos *in vitro*); e comparar ambas às tendências estimadas para a população geral, de forma a caracterizar os impactos da produção *in vitro* de embriões sobre a população Guzerá no Brasil.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Dados

Informações referentes à produção de oócitos e embriões foram analisadas baseando-se em um arquivo de dados contendo resultados de 5.716 sessões de OPU/IVF (que originaram 34.696 embriões) realizados em 1.205 doadoras da raça Guzerá, originadas de 16 rebanhos com diferentes propósitos de seleção (corte, leite e duplo propósito), filhas de 262 touros. Os animais

tinham entre 1 e 20 anos de idade ao momento da OPU. As sessões foram efetuadas por uma empresa privada de produção de embriões, entre março de 2003 e julho de 2013. O número de sessões por doadora variou de 1 a 49 e os intervalos entre sessões (na mesma doadora) variaram de 7 a 120 dias. Sêmen de um total de 147 touros foi utilizado no procedimento de IVF.

Dados de produção e genealogia utilizados neste estudo foram obtidos do Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite (PNMGuL) e de 31 rebanhos localizados no nordeste (6 estados), centro-oeste (1 estado) e sudeste (4 estados) do Brasil. Para a idade ao primeiro parto (A_{FC}), dados de 3.194 partos de vacas Guzerá, variando entre 660 a 1.458 dias foram analisados. Os dados de produção de leite consistiam de 5.394 registros de lactação de 4.108 vacas Guzerá que pariram entre 1990 e 2010, filhas de 566 touros. Destes, 3.194 eram registros de primeira lactação, truncados aos 305 dias (PL_{305}).

A matriz de parentesco utilizada em todas as análises realizadas no presente estudo continha 6.850 animais (mais 5.716 entradas referentes à OPU/IVEP de forma a se estimar o coeficiente de endogamia dos mesmos). O coeficiente de endogamia foi calculado a partir do arquivo de genealogia baseando-se em uma adaptação do método descrito por Meuwissen and Luo (1992), disponível no software ASREML (versão 4.0, GILMOUR, 2014). O mesmo arquivo de genealogia foi utilizado para estimação dos valores genéticos para características relacionadas à produção *in vitro* de embriões, para a idade ao primeiro parto e para a produção de leite em 305 dias.

As tendências genéticas e do coeficiente de endogamia (F) foram obtidas pela regressão linear (e quadrática) dos valores genéticos estimados (EBVs) para cada característica analisada no ano de nascimento dos animais (ou ano da fertilização *in vitro* no caso de embriões). Para este propósito, três arquivos de dados foram criados. O primeiro contendo informações para as 1.205 doadoras (D_{POP}), o segundo contendo informações dos 6.850 indivíduos que integram o total da população avaliada (T_{POP}), e o terceiro arquivo de dados contendo informações sobre os 34.696 embriões produzidos *in vitro* entre 2003 e 2013 (E_{POP}).

Para obter tendências mais acuradas, tanto o coeficiente de endogamia quanto o valor genético estimado para os acasalamentos (IVF) foram

ponderados pelo número de embriões produzidos em cada sessão. Dessa forma, cada embrião produzido foi tratado como um “indivíduo” em uma subpopulação, considerando a doadora do oócito como sua mãe, e o touro cujo sêmen foi utilizado na IVF seu pai. Os bancos de dados foram analisados de forma a comparar os parâmetros estimados considerando doadoras e embriões produzidos *in vitro* como subpopulações da população Guzerá de duplo propósito no Brasil.

3.2.2 Punção ovariana e produção *in vitro* de embriões

As estruturas foram obtidas por punção ovariana guiada por ultrassom, como descrito por Seneda (2001), seguida de fertilização *in vitro* um dia após aspiração. As sessões de OPU foram realizadas por técnicos de uma empresa de produção de embriões, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Os procedimentos e métodos da punção ovariana e da produção *in vitro* de embriões foram realizados como descrito por Perez et al. (*in press*). Oócitos foram classificados conforme seu grau de viabilidade de acordo com o número de células do cumulus e de aspectos visuais do citoplasma do complexo cumulus-oócito (graus I, II e III, sem cumulus, expandidos, atresícos ou degenerados), como descritos por Lonergan (1992).

3.2.3 Estimação de componentes de variância

Os componentes de variância foram estimados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML) por meio do software ASREML (versão 4.0, GILMOUR et al., 2014), utilizando modelo animal.

De forma a estimar parâmetros genéticos e valores genéticos para a produção de leite (PL₃₀₅), os registros de lactação foram previamente ajustados para 305 dias de lactação. O modelo de análise incluiu os efeitos fixos de rebanho-ano do parto (hy_i) e estação de parto ($season_j$). Efeitos aleatórios de animal ($animal_k$), ambiente permanente (pe_l) e residual (e_{ijkl}) também foram incluídos.

$$y_{ijkl} = \mu + hy_i + season_j + animal_k + pe_l + e_{ijkl} \quad (1)$$

Para a análise da idade ao primeiro parto (A_{FC}) em dias, o modelo animal univariado (2) incluiu os efeitos fixos de rebanho-ano (hy_i) de nascimento da vaca e a estação do parto ($season_j$), assim como efeitos aleatórios de animal ($animal_k$) e residual (e_{ijk}).

$$y_{ijk} = \mu + hy_i + season_j + animal_k + e_{ijk} \quad (2)$$

Características relacionadas a produção de oócitos e embriões analisadas foram: número de oócitos viáveis (N_{OV}), número de embriões viáveis (N_{EMB}), percentual de oócitos viáveis (P_{OV}) e embriões viáveis (P_{EMB}). P_{OV} foi calculada como proporção do total de oócitos e P_{EMB} como proporção de N_{OV} . Transformação logarítmica ($\log_{10} X + 1$) foi aplicada a todas as variáveis (exceto para P_{OV}), de forma a buscar a normalidade de resíduos para atender à pressuposição da análise e permitir a estimação dos componentes de variância. A transformação logarítmica falhou em aprimorar a normalidade para P_{OV} , a qual já exibía distribuição aproximadamente gaussiana. Portanto, as tendências e parâmetros genéticos para P_{OV} são apresentados na escala original da variável, enquanto N_{OV} , N_{EMB} e P_{EMB} são apresentados na escala logarítmica ($\log_{10} X + 1$). O seguinte modelo foi comum às características relacionadas a produção de oócitos (N_{OV} , P_{OV}):

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + e_{ijklmn} \quad (3)$$

onde y_{ijklmn} representa a característica em análise; μ é o intercepto; hy_i é o efeito fixo de interação rebanho-ano da OPU ($i=1,2,\dots,108$); bh_j é o efeito fixo do rebanho de nascimento da doadora ($j=1,2,\dots,20$); $season_k$ é a estação da OPU ($k=1$ or 2); $intOPU_l$ é o efeito fixo das classes de intervalo entre as sessões de OPU ($l=1,2,\dots,6$); $tech_m$ é o efeito fixo do técnico responsável pela OPU ($m=1,2,\dots,7$); βAge e $\beta_2 Age$ representam a idade da doadora à OPU (em meses) como covariável (efeitos linear e quadrático); pe_o é o efeito aleatório de ambiente

permanente ($\alpha = 1, 2, \dots, 1205$); e e_{ijklmn} representa o efeito aleatório residual. Também foi incluído o efeito aleatório de animal ($animal_n$) de forma a estimar o componente genético aditivo.

Para características relacionadas a produção de embriões (N_{EMB} e P_{EMB}) o seguinte modelo foi proposto:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + IVFbull_p + e_{ijklmn}, \quad (4)$$

onde $IVFbull_p$ é o efeito aleatório do reprodutor cujo sêmen foi utilizado na IVF (pai dos embriões) ($\alpha = 1, 2, \dots, 147$) e todos os outros efeitos são idênticos aos definidos no modelo 3.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2.1, é mostrada a estatística descritiva para os dados analisados no presente estudo. Peixoto et al. (2006) reportaram média de 2.065 ± 922 Kg para produção de leite em 305 dias de lactação na raça Guzerá. Santos et al. (2013) reportaram média de $1.783.20 \pm 727,02$ Kg para produção de leite em estudo baseado em dados da população Guzerá leiteira. Considerando que a população estudada no presente estudo deriva da população Guzerá no Brasil, a média e respectivo desvio padrão para PL305 estão de acordo com os autores dos estudos anteriores.

A idade ao primeiro parto é uma importante característica reprodutiva e tem-se demonstrado efeito dramático da mesma sobre o ganho genético, a vida útil no rebanho e a rentabilidade total do sistema (WAHINYA et al., 2015). No entanto, é frequentemente reportada como tardia em vacas *Bos indicus* (AZEVEDO et al., 2006), principalmente devido aos desafios ambientais massivos que afetam os sistemas de produção extensivos em regiões tropicais. Os resultados do presente estudo confirmaram valores altos para a média para a idade ao primeiro parto em animais da raça Guzerá em sistemas de baixos insumos.

Tabela 2.1 Número de observações (N), reprodutores, vacas, médias, desvios padrão (SD), valores mínimo e máximo para as características analisadas (variáveis na escala da variável resposta) e número de grupos contemporâneos (CG).

Item	PL ₃₀₅	A _{FC}	N _{OV}	N _{EMB}	P _{OV} *	P _{EMB}
N	5.394	3.194	5.716	5.716	5.716	5.716
Média	2.119,01	1.207,20	15,61	6,07	59,03%	34,68%
SD	1.031,98	156,60	12,74	5,67	13,77%	19,68%
Min.	101	662	1	0	12,50%	0%
Max.	7.951	1.458	99	48	100%	100%
Vacas	4.108	3.452	1.205	1.205	1.205	1.205
Touros	566	455	262	262	262	262
CG	376	366	108	108	108	108

N_{OV}= número de oócitos viáveis; N_{EMB}= número de embriões viáveis; P_{OV}= percentual de embriões viáveis; P_{EMB}= percentual de embriões viáveis. A_{FC} = idade ao primeiro parto (em dias); PL₃₀₅ = produção de leite em 305 dias (em Kg). *Variável não transformada (log₁₀ X +1).

As médias fenotípicas para características relacionadas a produção *in vitro* de embriões foram estudadas tanto para raças *Bos indicus* quanto *Bos taurus* na literatura, evidenciando drásticas diferenças entre ambos os grupos genéticos. Ao trabalharem com doadoras da raça Gir, Vega et al., 2015 reportaram médias de $9,77 \pm 6,79$ e $75,25 \pm 20,5$ respectivamente para o número e percentual complexos cúmulos-oócito, características muito próximas a N_{OV} e P_{OV}. Porém, considerando oócitos grau IV que chegaram aos procedimentos de IVF. Os mesmos autores reportaram médias de $2,61 \pm 2,68$ e $35,47 \pm 34,62$ respectivamente para N_{EMB} e P_{EMB}. No presente estudo, doadoras Guzerá apresentaram médias muito superiores para N_{OV}, que se aproximam bem mais dos valores reportados por Pontes et al. (2010). Na literatura, médias para P_{OV} obtida em doadoras da raça Gir parecem maiores dos encontrados para a raça Guzerá no presente estudo (PONTES et al., 2010; VEGA et al. 2015). Isso provavelmente acontece pois, neste estudo, não foram considerados os oócitos de grau IV como sendo completamente viáveis (mesmo quando atingiram a clivagem, seguindo para a IVF). Para propósitos de análise genética, não há interesse em considerar os oócitos de grau IV na análise, uma vez que apenas um pequeno percentual destes permanece viável durante os procedimentos da

produção *in vitro*. Merton et al. (2009) trabalharam com vacas da raça Holandesa e reportaram medias de 7,8; 26,6%; 1,8 e 22,4% para N_{OV} ; P_{OV} ; N_{EMB} e P_{EMB} , respectivamente, mostrando diferenças claras entre os grupos genéticos.

3.3.1 Tendências de endogamia

A média do coeficiente de endogamia (F) (Tabela 2.3), ao considerar todos os indivíduos das três populações analisadas, indica que D_{POP} e E_{POP} apresentam valores mais elevados do que T_{POP} . A média de F para os animais endogâmicos ($F > 0\%$) foi similar nos três conjuntos de dados. Os resultados apontam que apesar de D_{POP} e E_{POP} apresentarem maior valor médio de F, T_{POP} apresenta maior média de F para indivíduos endogâmicos.

Tabela 2.3 Valor médio de F, média de F para indivíduos endogâmicos e amplitude dos valores de F para os bancos de dados analisados (T_{POP} , D_{POP} , E_{POP}).

Item	T_{POP}	D_{POP}	E_{POP}
F médio (%)	$0,89 \pm 2,72^a$	$1,95 \pm 2,68^b$	$1,32 \pm 3,13^c$
F médio (%) - Endogâmicos	$2,48 \pm 3,52^a$	$2,26 \pm 3,39^a$	$2,17 \pm 3,15^a$
Amplitude (%)	0 – 31,16	0 – 30,50	0 – 25,24

¹ Letras (a,b,c) diferentes nas colunas representam diferença estatística entre as médias.

Na Figura 1.1 é mostrada a tendência média anual do coeficiente de endogamia (F) para T_{POP} (1.B, $n = 12.566$), D_{POP} (1.A, $n = 1.205$) e para E_{POP} (1.C, $n = 34.696$). Em geral, as tendências apresentadas foram positivas. Esse resultado indica que a média de F está aumentando na população Guzerá como consequência do aumento da frequência de acasalamentos entre animais aparentados. Resultados similares foram reportados por Peixoto et al. (2010), também para a população Guzerá, revelando o uso intenso de alguns touros e seus descendentes. A Figura 1.A mostra uma tendência quadrática positiva para a média anual dos valores de F na população geral (T_{POP}). O coeficiente de regressão do componente linear (β_1) foi 0,0781 ($P < 0.001$), enquanto o componente quadrático (β_2) foi de 0,00766 ($P < 0.05$), apontando para valores ainda maiores de F quando considerados animais nascidos após 2001. Esta

data, por sua vez, coincide com a implementação comercial das tecnologias de OPU/IVEP em rebanhos brasileiros, assim como com a publicação do primeiro resultado de avaliação genética na raça Guzerá. Nos anos que se seguiram ao início dos programas de melhoramento da raça Guzerá para corte e leite, definiu-se o controle da endogamia como importante medida, uma vez que as raças zebuínas no Brasil são conhecidas por derivar de um número reduzido de animais (PEIXOTO et al., 2010), possivelmente sofrendo de efeito fundador. Isso pode explicar a queda no valor anual média de F entre os anos de 1996 e 2001. No entanto, a partir do ano 2000, quando as primeiras avaliações genéticas foram publicadas, o uso de touros de alto mérito genético, os quais invariavelmente tinham algum grau de parentesco, se intensificou, aumentando a probabilidade da ocorrência de acasalamentos endogâmicos. Este fato explica o aumento pronunciado do valor médio anual de F após o ano 2000. STACHOWICS et al. (2011) indicaram que o aumento da tendência anual de F , na população da raça Holandesa do Canadá, estava associada à implementação de avaliações baseadas na metodologia BLUP e no uso massivo de biotécnicas reprodutivas. Os resultados da média anual de F para T_{POP} sugerem que o comportamento observado por Stachowics et al. (2011) pode estar em processo de ocorrência na população Guzerá do Brasil.

Os valores anuais médios para T_{POP} variaram entre 0,6% e 1,6%. Estes valores são menores do que os encontrados para as raças Holandesa (HINRICHS, TALLER, 2011; ROKOUEI et al., 2010; SØRENSEN et al., 2005) e Jersey (STACHOWICZ et al., 2011) na literatura. Quando comparados com os resultados apresentados para raças zebuínas, os valores estimados neste estudo se assemelham aos encontrados por Peixoto et al. (2010), porém apresentam-se inferiores aos observados para a raça Gir (SANTANA JR. et al. 2014; REIS FILHO et al., 2010). Ao analisarem dados de uma população Nelore no Brasil, Santana Jr. et al (2010), reportaram coeficiente de endogamia médio de 1,4%. Vieira et al. (2005) também reportaram maior média de F ao estudarem uma população Guzerá.

A Figura 1.B mostra tendência positiva do coeficiente de endogamia médio para D_{POP} , como observado para T_{POP} , no entanto apenas o coeficiente linear foi significativo. Para D_{POP} , o coeficiente de regressão linear estimado foi

(β_1) de 0,0814 ($P < 0.001$). A tendência anual de F para D_{POP} apresentou o maior valor de média observado entre os três conjuntos de dados analisados (em 2010; $F = 2.3\%$). A tendência anual da endogamia para E_{POP} (1.C), calculada a partir do ano de realização da IVF, exibiu coeficiente de regressão (β_1) de 0.0266 ($P < 0.05$), o qual também sugere aumento do coeficiente de endogamia durante o período estudado. Para quase toda a série temporal estudada, a média anual de F para E_{POP} foi maior do que a observada para T_{POP} e D_{POP} no mesmo ano. As únicas exceções foram as médias dos anos de 2010 e 2011. Os valores de F observados para E_{POP} não foram alarmantes. No entanto, as médias altas reportadas indicam que a produção *in vitro* de embriões pode estar introduzindo (futuros) indivíduos com maiores valores de F do que os comumente observados na população em geral e, dessa forma, pode contribuir para o aumento da endogamia nas próximas gerações.

Na Tabela 2.4 são mostradas as frequências e percentuais de indivíduos (T_{POP} e D_{POP}) e embriões produzidos *in vitro* (E_{POP}) observadas para os grupos de F considerando animais nascidos entre 1994 e 2009; e embriões produzidos *in vitro* entre 2003 e 2013. O percentual de indivíduos com valores de F entre 0 e 1% para D_{POP}, E_{POP} e T_{POP} foi 51,37%; 62,60% e 82,42% respectivamente. Fica claro que a diferença em número e percentual de indivíduos é diluída entre as classes de maiores valores de F para E_{POP} e D_{POP}. Para as classes entre 1% e 7% F, o percentual de indivíduos foi de 32,71%; 40,17% e 14,05% do total, respectivamente, para E_{POP}; D_{POP} e T_{POP}. Isso sugere que doadoras submetidas à OPU/IVF possuem maior valor de F do que os valores mais frequentes na população.

Grupos de indivíduos com F superior à 7% representaram 4,68%; 8,46% e 2,84% do total, respectivamente para E_{POP}; D_{POP} e T_{POP}. Os resultados apresentados podem indicar a formação de um estreitamento na população de doadoras (D_{POP}), provavelmente associado ao sucesso de fêmeas de determinadas famílias à OPU/IVF. Comportamento similar foi apresentado anteriormente por Peixoto et al. (2010) ao estudar a população Guzerá selecionada para produção de leite no Brasil.

Figura 1.1 Tendências do coeficiente de endogamia para a população geral (1.A - T_{POP}), doadoras (1.B - D_{POP}), e para os embriões produzidos *in vitro* (1.C - E_{POP}) observadas no período estudado.

Tabela 2.4 Frequência (N) e percentual (%) de indivíduos (ou embriões produzidos *in vitro*) de acordo com as classes do coeficiente de endogamia.

F (classe - %)	Embriões IVEP *		Doadoras		População Geral	
	N	%	N	%	N	%
F = 0.00	12404	35,75	354	29,38	7875	62,67
0,00 < F ≤ 0,01	9315	26,85	265	21,99	2482	19,75
0,01 < F ≤ 0,02	3762	10,84	187	15,52	712	5,07
0,02 < F ≤ 0,03	2616	7,54	106	8,80	329	2,66
0,03 < F ≤ 0,04	1937	5,58	78	6,47	352	2,80
0,04 < F ≤ 0,05	1804	5,20	52	4,32	195	1,55
0,05 < F ≤ 0,06	582	1,68	26	2,16	108	0,85
0,06 < F ≤ 0,07	647	1,86	35	2,90	155	1,12
0,07 < F ≤ 0,08	538	1,55	20	1,66	123	0,98
0,08 < F ≤ 0,09	430	1,24	19	1,58	57	0,45
0,09 < F ≤ 0,10	45	0,13	26	2,16	36	0,28
F > 0,10	612	1,76	37	3,07	142	1,13
Total	34.696	100	1.205	100	12.566	100

*N para os dados de embriões IVEP se refere a cada embrião como um indivíduo.

Apesar do período estudado não ter mostrado valores alarmantes do coeficiente de endogamia para T_{POP} , os resultados sugerem que devem haver esforços visando o controle de acasalamentos endogâmicos, de forma a prevenir futura redução da variação de origem genética nas próximas gerações.

3.3.2 Tendências Genéticas

3.3.2.1 Idade ao primeiro parto

De um total de 3.194 animais constantes no banco de dados de idade ao primeiro parto, 534 tinham informações de produção de embriões *in vitro*. Outras 385 vacas tiveram seu mérito genético estimado indiretamente, por possuírem conexões próximas aos animais com informação fenotípica. O valor genético dos embriões foi estimado a partir do seu parentesco.

A Figura 1.2 apresenta a tendência anual do valor genético estimado (EBVs) da A_{FC} para T_{POP} (2.A), D_{POP} (2.B) e E_{POP} (2.C).

As tendências genéticas anuais (Figura 1.2) para A_{FC} foram, no geral, negativas. Para T_{POP} (Figura 2.A), uma diminuição de 0,123 dias/ano foi observada, apesar de não significativa ($P>0,05$). No caso de D_{POP} , a tendência genética foi significativamente ($P<0,001$) negativa, indicando a diminuição média de 0,431 dias/ano. Esse resultado mostra que fêmeas Guzerá selecionadas como doadoras possuem mérito genético “superior” para A_{FC} do que fêmeas não-doadoras nascidas no mesmo ano. Ao estudarem fêmeas da raça Holandesa criadas em um ambiente desafiador, Farajh-Arough et al. (2011) observaram tendência genética anual de -0,75 dias/ano, valor inferior ao observado para T_{POP} e D_{POP} . No entanto, deve-se manter claro que, no Brasil, A_{FC} (ainda) não é uma característica diretamente selecionada em rebanhos leiteiros, tendo maior relevância como critério de seleção em rebanhos de corte (LOAIZA-ECHEVERRI et al., 2013), enquanto a raça Holandesa sofre seleção mais intensa para tal característica.

A Figura 2.C mostra a tendência genética para A_{FC} em E_{POP} . O decréscimo linear representado pelo coeficiente de regressão observado de -1.45 dias/ano é muito “menor” do que os observados para T_{POP} e D_{POP} . Os valores de média anual encontrados para A_{FC} em E_{POP} foi menor (porém, favorável) do que os observados para T_{POP} e D_{POP} no período de interseção (2003-2011). O gráfico (Figura 2.C) indica a existência de dois momentos distintos. O primeiro (entre 2003 e 2007) apresenta clara e pronunciada diminuição da média anual dos valores genéticos estimados para A_{FC} . O momento seguinte, entre 2007 e 2012, mostram um pequeno aumento de médias anuais. De 2012 a 2013, houve novamente diminuição dos valores médios. Portanto, o primeiro momento representa o aumento do uso da OPU/IVEP em rebanhos de corte, onde se popularizou inicialmente (BONI, 2012). O segundo momento é principalmente atribuível ao início da utilização de sêmen sexado, tornando a OPU/IVEP começou a ser aplicada de forma consistente em rebanhos leiteiros.

Figura 1.2 Tendências genéticas para A_{FC} na população geral (3.A - T_{POP}), na subpopulação de doadoras (3.B - D_{POP}), e na subpopulação de embriões produzidos *in vitro* (3.C) observadas no período estudado.

Tendências genéticas observadas para A_{FC} no presente estudo indicam que fêmeas submetidas à OPU/IVF entre 2003 e 2013; e dos embriões produzidos a partir desta biotecnologia, foram superiores quando comparados com a população Guzerá de duplo propósito no Brasil.

3.3.2.2 Produção de leite

A análise genética da produção de leite em 305 dias de lactação (PL_{305}), foi realizada com base em 5.394 registros, de 4.108 vacas Guzerá. Destas, 581 encontravam-se também no arquivo de dados de produção *in vitro* de embriões, tendo seu mérito genético estimado a partir do seu fenótipo. Outras 412 vacas tiveram seu mérito genético estimado indiretamente, por possuírem conexões próximas aos animais com informação fenotípica. O valor genético dos embriões foi estimado a partir do seu parentesco, constituindo-se, portanto, do valor genético parental.

As tendências anuais das medias do valor genético estimado para PL_{305} foram positivas tanto para a população geral (T_{POP}) quanto para as subpopulações (D_{POP} e E_{POP}) estudadas (Figura 1.3). A Figura 3.A apresenta a tendência genética anual para T_{POP} , o qual consistiu em um aumento médio de 6,63 Kg/ano para vacas nascidas entre 1994 e 2009. Não foi encontrada tendência significativa entre 1994 e 1999, mas após o ano 2000, o coeficiente de regressão assumiu comportamento linear positivo. Tendências similares foram reportadas por Bruneli et al. (2014) para o mesmo período (entre 2000 e 2009), ao estudarem a população Guzerá no Brasil. Estes resultados podem ser atribuídos à primeira avaliação genética para produção de leite publicada no 2000, a qual favoreceu a escolha, por parte dos criadores, de touros de alto mérito genético.

Na Figura 3.B é apresentada a tendência genética para PL_{305} em D_{POP} . Foi observado ganho genético anual médio de 8,02 Kg/ano. Após o ano 2000, a média anual de EBVs para PL_{305} na população de doadoras (D_{POP}) foi do que a média encontrada nos mesmos anos na população geral (T_{POP}). Esse resultado confirma a pressuposição de que doadoras representam indivíduos de alto mérito genético na população.

A Figura 3.C as médias anuais dos valores genéticos estimados para os embriões nascidos entre 2003 e 2013 (E_{POP}), sendo observada tendência linear positiva. O resultado mostra um ganho genético anual médio de 10,40 Kg/ano, valor superior aos observados em T_{POP} e D_{POP} . No entanto, as medias anuais dos valores genéticos estimados para PL_{305} na subpopulação de embriões

foram, em geral, as menores dentre os conjuntos de dados analisados. Isso ocorre, principalmente, devido aos touros oriundos de seleção para a produção de carne presentes nos dados de fertilização *in vitro*, os quais possuem menor valor genético para a produção de leite.

Peixoto et al. (2006) reportaram tendências de +6,47 Kg/ano para vacas Guzerá que pariram entre 1997 e 2004. Este valor é maior do que a tendência observada em no presente estudo em T_{POP}, porém, inferior aos coeficientes de regressão estimados para D_{POP} e E_{POP}.

Os resultados de tendência genética de PL₃₀₅ para vacas Guzerá submetidas à OPU/IVF (D_{POP}), para o período analisado no presente estudo, apresentaram maiores valores genéticos do que aqueles apresentados pelos indivíduos contidos na população geral nascidos nos mesmos anos. Apesar do mérito genético estimado para os embriões ter, em média, menores valores anuais, os coeficientes de regressão mais elevados podem ser atribuídos a redução do intervalo de geração nesta subpopulação especificamente.

Figura 1.3 Tendências genéticas para PL₃₀₅ na população geral (3.A - T_{POP}), na subpopulação de doadoras (3.B - D_{POP}), e na subpopulação de embriões produzidos *in vitro* (3.C) observadas no período estudado.

3.3.2.3 Características relacionadas à produção de óocitos e embriões

Não foram observadas tendências lineares evidentes para características relacionadas a produção *in vitro* de embriões. Todos os coeficientes de regressão foram não significantes ($P > 0,05$) tanto para o termo linear, quanto quadrático. Da mesma forma, os valores de coeficiente de determinação foram baixos (entre 0,033 e 0,11).

Considerando que nenhuma dessas características foi selecionada na população considerada neste estudo, a ausência de tendência pronunciada ou significativa é compreensível (Figura 1.4). Comparando as médias dos valores genéticos estimados para as quatro características estudadas, observa-se que N_{OV} e N_{EMB} assumem valores positivos por toda a série temporal estudada, enquanto P_{OV} e P_{EMB} apresentam valores médios negativos em diversos anos. Este resultado sugere que a seleção indireta pode ter ocorrido para as características numéricas (N_{OV} e N_{EMB}). Uma explicação para isso encontra-se nos processos ocorridos na empresa responsável pela OPU/IVF. O número de estruturas coletadas por sessão, sendo a primeira informação a ser registrada, assume relevante papel na categorização das doadoras por sua produtividade. Da mesma forma, o número de embriões produzidos por doadora caracteriza sua rentabilidade em um programa de produção de embriões.

Figura 1.4 Tendências genéticas para Nov (4.A); Pov (4.B); NEMB (4.C) e P_{EMB} (4.D) estimada na subpopulação de doadoras (por ano de nascimento).

Animais que produzem mais oócitos à OPU tendem a ser submetidos a um maior número de procedimentos de coleta do que animais que produzem menos estruturas. O mesmo é esperado de vacas que produzem mais embriões à IVF. Características relacionadas aos percentuais de oócitos e embriões tendem a receber menos atenção nas raças *Bos indicus* devido a sua capacidade de produzir grandes quantidades de oócitos. Além disso, as vacas

filhas de doadoras (produzidas *in vitro*) tendem a representar os indivíduos de maior mérito genético na população, tendo maior probabilidade de serem selecionadas como doadoras na próxima geração. Esse processo pode estar causando a transferência de alelos favoráveis à produção *in vitro* de embriões através das gerações de doadoras.

3.3.3 Associação genética entre características produtiva, reprodutiva e relacionadas a produção *in vitro* de embriões

Correlações genéticas “empíricas” entre PL₃₀₅, A_{FC} e características relacionadas a produção *in vitro* de embriões foram obtidas através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os EBVs para estas características em indivíduos de D_{POP} (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores genéticos estimados para A_{FC}, PL₃₀₅ e a produção *in vitro* de embriões.

Item	N*	Nov	N _{EMB}	P _{OV}	P _{EMB}
PL ₃₀₅	993	0,077	0,094	-0,002	0,065
A _{FC}	919	-0,001	-0,009	0,107	-0,014

* Número de indivíduos com valor genético estimado para ambas as características.

No geral, correlações entre EBVs foram todas próximas de zero. A correlação ligeiramente mais alta foi observada entre A_{FC} e P_{OV}, a qual é desfavorável, porém, ainda de magnitude muito baixa,

Merton et al. (2009) também reportaram, para animais da raça Holandesa, correlações próximas de zero entre os valores genéticos estimados para o número de complexos cumulus-oócito (equivalente à Nov) para 74 touros e os índices de fertilidade de suas filhas. Estes resultados sugerem que, provavelmente, existe fraca associação entre a produção *in vitro* de embriões com a reprodução natural e a produção de leite.

Tendências anuais favoráveis foram observadas para PL₃₀₅ e A_{FC}, enquanto a produção *in vitro* de embriões apresentou tendências não significativas. Esse resultado reforça a ideia da existência de fraca associação entre tais características. Torna-se possível, então, inferir que a seleção para a

produção *in vitro* de embriões não exerce influência sobre o mérito genético da população quanto a produção de leite e idade ao primeiro parto.

3.4 CONCLUSÃO

Os embriões produzidos *in vitro*, gerados entre 2003 e 2013 e analisados neste estudo apresentaram tendências genéticas favoravelmente pronunciadas para PL₃₀₅ e AFC. No entanto, também foram observados coeficiente de endogamia médio ligeiramente superiores do que os encontrados para o total da população. Tendências reportadas para a endogamia na população não apresentaram valores alarmantes para o período estudado, mas podem representar um risco para a manutenção da diversidade genética nas gerações futuras se não controlada de forma efetiva. Além disso, um possível estreitamento pode estar ocorrendo uma vez que o número de animais dentro dos grupos de elevado coeficiente de endogamia foi mais frequente dentro da subpopulação de doadoras do que na população geral.

Características relacionadas a produção *in vitro* de embriões apresentaram fracas e não significantes tendências genéticas, confirmando sua condição de característica nunca antes diretamente selecionadas na população estudada.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, D.M.M.R.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.N.B.; MALHADO, C.H.M.; LÔBO, R.B.; MOURA, A.A.A.; PIMENTA FILHO, E.C. Desempenho reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.988-996, 2006

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

BRUNELI, F.A.T.; CANDA, R.A.; SANTOS, G.G.; MACHADO, C.H.C.; LOPES, P.S.; PEIXOTO, M.G.C.D. Phenotypic and Genetic Trends for Growth and Milk Traits of Guzera Breed in Dual Purpose Herds. Proceedings, **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, Vancouver – Canada, 2014.

FARIA, F.J.C.; VERCESI FILHO, A.E.; MADALENA, F.E. Variabilidade genética da raça Guzerá. **Proceedings of the V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. Universidade de São Paulo, São Paulo. CD-ROM, 2004.

FARIA, F.J.C.; FILHO, A.E.V.; MADALENA, F.E.; JOSAKIAN, L.A. Pedigree analysis in the Brazilian Zebu breeds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 126, 148–153, 2009.

FARAJI-AROUGH, H.; ASLAMINEJAD, A.A.; FARHANGFAR, H. Estimation of Genetic Parameters and Trends for Age at First Calving and Calving Interval in Iranian Holstein Cows. **Journal of Research in Agricultural Science** Vol. 7, No.1, pages: 79-87, 2011.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.L.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.; Thompson, R. ASReml user Guide Release 4.0 VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK. www.vsnl.co.uk, 2014.

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

HINRICHS, D. and THALLER, G. Pedigree analysis and inbreeding effects on calving traits in large dairy herds in Germany. **Journal of Dairy Science**, 94 :4726–4733, . 2011.

International Embryo Transfer Society. 2014. Statistics and data retrieval committee report. **Embryo Transfer Newslett**, 32(4).

KADARMIDEEN, H.N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y.F.; STRØBECH, L.; BARUSELLI, P.S.; MEIRELLES, F.V.; CALLESEN, H.; HYTELL, P.; FERRAZ, J.B.S.; NOGUEIRA, M.F.G. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.389-396, 2015.

KÖNIG, S.; BOSSELMANN, F.; VON BORSTEL, U.; SIMINIANER, H. Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90:3945-3954, 2007.

LEITCH, H.W.; SMITH, C.; BURNSIDE, E.B. and QUINTON, M. Effects of female reproductive rate and mating design on genetic response and inbreeding in closed nucleus dairy herds. **Animal Science**, 60: 389–400, 1995.

LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; BERGMANN, J.A.G.; TORAL, F.L.B.; OSORIO, J.P., CARMO, A.S.; MENDONÇA, L.F.; MOUSTACAS, V.S. and HENRY, M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzerat bulls raised under grazing conditions. **Theriogenology**, 79:751–759, 2013.
MADALENA, F.E. Animal Breeding and development – South American perspective. *Journal of Animal Breeding and Geneics*, 171–172, 2012.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and cultivation of bovine follicular oocytes. Doctoral thesis, National University of Ireland, 1992.

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

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.

MEUWISSEN, T.H.E and Luo, Z. Computing inbreeding coefficients in large populations. **Genetics Selection Evolution**, 24, 305-313, 1992.

NICHOLAS, F.W. and SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Anim. Prod.**, 36: 341-353, 1983.

NICHOLAS, F.W.; Genetic improvement through reproductive technology. **Animal Reproduction Science**, 42. 205-214, 1996.

PANETTO, J.C.C.; VAL, J.E.; MARCONDES, C.R.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; FERRAZ, J.B.S.; GOLDEN, B.L. Female fertility in a Guzerat dairy subpopulation: Heterogeneity of variance components for calving intervals. **Livestock Science** 145, 87–94, 2012.

PEDERSEN, L.D.; KARGO, M.; BERG, P.; VOEGAARD, J.; BUCH, L.H.; SØRENSEN, A.C. Genomic selection strategies in dairy cattle breeding programmes: Sexed semen cannot replace multiple ovulation and embryo transfer as superior reproductive technology. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. ISSN 0931-2668, 2012.

PEIXOTO, M.G.C.D.; PEREIRA, C.S.; FONSECA, C.G.; MADALENA, F.E.; Seleção para produção de leite em núcleos MOET das raças zebuínas: um estudo de simulação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57, 673–683, 2005.

PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; PENNA, V.M.; MARTINEZ, M.L. Genetic trend for milk yield in Guzerat herds participating in progeny testing and MOET nucleus schemes. **Genetics and Molecular Research**, 5, 454–465, 2006.

PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; PEREIRA, M.C.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, M.R.S. Impact of milk production milk breeding program on the Guzerat Population structure in Brazil. The 2009 Interbull Meeting, Barcelona, Spain, 2009.

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.

PENNA, V.M.; MADALENA, F.E.; ALVIM, M.T.T. Open MOET Nucleus of Selection in Guzerá. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia. CD-ROM, 1998.

PEREIRA, R.J.; VERNEQUE, R.S.; LOPES, P.S.; SANTANA JÚNIOR., M.L.; LAGROTTA, M.R.; TORRES, R.A.; VERCESI FILHO, A.E.; MACHADO, M.A.. Milk yield persistency in Brazilian Gyr cattle based on a random regression model. **Genetics and Molecular Research**, 11 (2): 1599-1609, 2012.

PEREZ, B.C; PEIXOTO, M.G.C.D.; BRUNELI, F.T.; RAMOS, P.V.B.; BALIEIRO, J.C.C. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, *in press*.

PONSART, C.; LE BOURHIS, D.; KNIJN, H.; FRITZ, S.; GUYADER JOLY, C.; OTTER, T.; LACAZE, S.; CHARREAUX, F.; SCHIBLER, L.; DUPASSIEUX, D. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. **Reproduction Fertility and Development**, 26:12-21, 2014.

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

SANTANA JÚNIOR, M.L.; LOPES, P.S.; VERNEQUE, R.S.; PEREIRA, R.J.; LAGROTTA, M.R.; PEIXOTO, M.G.C.D. Parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros e vacas Gir leiteiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1717-1722, 2010.

SANTANA JÚNIOR, M.L.; PEREIRA, R.J.; BIGNARDI, A.B.; EL FARO, L.; TONHETI, H.; ALBUQUERQUE, L.G. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. **Livestock Science** 163 (2014) 26–33, 2014.

SENEDA, M.M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vitro de ovócitos bovinos. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2001.

WAHYNIA, P.K.; OKENO, T.O.; KOSGEY, I.S.; and KAHN, A.K. Economic and Biological Values for Pasture-Based Dairy Cattle Production Systems and their Application in Genetic Improvement in the Tropics. **Journal of Animal Production**, 5(5): 664-675, 2015.

SØRENSEN, A.C.; SØRENSEN, M.K.; BERG, P. Inbreeding in Danish dairy cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, 88, 1865–1872, 2005.

SMITH C. Applications of embryo transfer in animal breeding. **Theriogenology**, 29:203-212, 1988.

STACHOWICKZ, 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, 2014.

STROEBECH, L.; MAZZONI, G.; PEDERSEN, H.S.; FREUDE, K.K.; KADARMIDEEN, H.N.; CALLESEN, H.; HYTELL, P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.465-472, 2015.

VAN WYK, J.B.; FAIR, M.D.; CLOETE, S.W.P. Case study: The effect of inbreeding on the production and reproduction traits in the Elsenburg Dormer sheep stud. **Livestock Science**, 120, 218–224, 2009.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, 65:914-925, 2006.

VEGA, W.H.O.; QUIRINO, C.R.; SERAPIÃO, R.V.; OLIVEIRA, C.S.; PACHECO, A. Phenotypic correlations between ovum pick-up in vitro production traits and pregnancy rates in Zebu cows. **Genetics and Molecular Research** 14 (3): 7335-7343, 2015.

VERNEQUE, R.S.; TORRES FILHO, J.C.; REIS FILHO, J.C.; MARTINEZ, M.L.; LOPES, P.S.; TEODORO, R.L.; MACHADO, M.A.; PEIXOTO, M.G.C.D. Population Genetic Structure of Brazilian Gyr Dairy Cattle. **Proceedings of the 8th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production**, Belo Horizonte, Brazil, 2006.

CAPÍTULO 3. Efeitos da endogamia sobre a produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá.

B.C. Perez¹, J.C.C. Balieiro², F.A.T. Bruneli³, G.G. Santos³, e M.G.C.D. Peixoto³

¹ Programa de Pós Graduação – Qualidade e produtividade animal., Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

² Departamento de Nutrição e Produção Animal., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³ Embrapa Gado de Leite, CNPGL, Juiz de Fora, MG, Brasil

⁴ Associação Brasileira dos Criados de Zebu. ABCZ, Uberaba, MG, Brasil

RESUMO. O objetivo deste estudo foi estimar o efeito da endogamia sobre os resultados de produção *in vitro* de embriões na população Guzerá no Brasil. O percentual de indivíduos (e embriões) não-endogâmicos e a média do coeficiente de endogamia para as dadoras, embriões e reprodutores foi 29,38%; 35,76%; 42,86% e $1,98 \pm 2,68$; $1,32 \pm 3,13$; $2,08 \pm 2,79$, respectivamente. O coeficiente de endogamia da doadora, do reprodutor e dos embriões foram incluídos tanto como variáveis categóricas, quanto variáveis contínuas (efeitos linear e quadrático). Dois modelos distintos foram aplicados, um para explicar características de produção de oócitos, outro para características de produção de embriões. O aumento do coeficiente de endogamia (F) da doadora prejudicou de forma significativa o número de oócitos viáveis (N_{OV}), número de oócitos grau I (N_{GI}) e número de embriões clivados (N_{CLV}). Além disso, maiores valores de F da doadora influenciaram o percentual de oócitos de grau I (P_{GI}), percentual de embriões viáveis (P_{EMB}) e percentual de embriões clivados que se tornaram embriões viáveis (P_{CXE}). Não foi observado efeito significativo da endogamia do reprodutor (pai dos embriões) sobre a produção *in vitro* de embriões. O aumento do coeficiente de endogamia dos embriões influenciou o número de embriões viáveis, o percentual de embriões viáveis (P_{EMB}); e percentual de embriões clivados que se tornaram embriões viáveis (P_{CXE}). Os resultados sugerem que o aumento do coeficiente de endogamia dos embriões pode ser desfavorável a capacidade do embrião de sobreviver aos desafios impostos pelo ambiente *in vitro*. Submeter fêmeas Guzerá endogâmicas à biotécnica de produção *in vitro*

de embriões pode, à longo prazo, reduzir o número de embriões viáveis obtidos por doadora. Isto pode, conseqüentemente, ocasionar em aumento de custo dos programas de produção de embriões bovinos. Altos níveis de endogamia devem, portanto, ser evitados na escolha de fêmeas Guzerá como doadoras e no planejamento de acasalamentos para produção *in vitro* de embriões.

Palavras chave: reprodução artificial; depressão endogâmica; homozigose; punção ovariana; fertilização *in vitro*; zebuínos

ABSTRACT. The objective of this study was to estimate the effect of inbreeding over *in vitro* embryo production traits in a dual-purpose Guzerá breed population. The percentage of non-inbred individuals (or embryos) and mean inbreeding coefficient of donors, embryos and sires were 29.38%; 35.76%; 42.86% and 1.98 ± 2.68 ; 1.32 ± 3.13 ; 2.08 ± 2.79 , respectively. Inbreeding coefficient of the donor, the sire (used in on *in vitro* fertilization) and the embryo were, separately, included in the proposed models as either a class variable or continuous variable (linear and quadratic effects). Two different models were used, one for oocyte production traits and one for embryo production traits. The increase of inbreeding of the donor significantly impaired the number of viable oocytes (N_{OV}), number of grade I oocytes (N_{GI}) and number of cleaved embryos (N_{CLV}). Also, donor F influenced the percentage of grade I oocytes (P_{GI}), percentage of viable embryos (P_{EMB}) and percentage of cleaved embryos that turn into embryos (P_{CXE}). No significant effects were observed for the sire (father of the embryos) inbreeding over the traits analyzed. Embryos inbreeding influenced the number of viable embryos (N_{EMB}), percentage of viable embryos (P_{EMB}), and percentage of cleaved embryos that turn into embryos (P_{CXE}). Results suggest that increase in embryo inbreeding might be unfavorable to embryos ability to survive the challenges that *in vitro* environment demands. Submitting highly inbred Guzerá female donors to *in vitro* embryo production technologies may, in long-term, reduce the number of embryos obtained per cow. This could, therefore, increase relative costs of embryo production programs. High levels of inbreeding should, therefore, be avoided when selecting Guzerá female donors and planning *in vitro* embryo production programs.

Key words: bovine artificial reproduction; inbreeding depression; homozygosis; ovum-pick up; *in vitro* fertilization; zebu cattle

4.1 INTRODUÇÃO

Endogamia é definida como o acasalamento de indivíduos os quais possuem um ou mais ancestrais em comum (FALCONER; MACKEY, 1996) e suas consequências são apresentadas em duas teorias bem estabelecidas. A primeira é fundamentada no modo de ação gênica denominado “dominância parcial”, no qual a endogamia é responsável por aumentar a frequência de indivíduos homozigotos na população, levando ao aumento de desordens recessivas indesejáveis (CROW; KIMURA, 1970; KEARNEY et al., 2014). A teoria da sobredominância sugere que indivíduos heterozigotos expressam fenótipo médio superior à ambos o homozigoto dominante e recessivo. A redução da frequência de heretorizogotos, consequentemente, reduziria a expressão da sobredominância na população (CROQUET et al., 2007). Como resultado da endogamia, verifica-se o efeito negativo sobre características de interesse econômico, conhecido por “depressão endogâmica” (DICKERSON, 1963).

Diversos estudos reportaram efeitos desfavoráveis da endogamia sobre características reprodutivas, tanto em gado de leite, quanto em gado de corte (GONZÁLEZ-RECIO et al., 2007; ROKOUEI et al., 2010; MC PARLAND et al., 2007; THOMPSON et al., 2000; SEWALEM et al., 2006; SANTANA JR. et al., 2010b). Assumindo que a reprodução natural pode ser definida como um processo biológico complexo, influenciado por inúmeros fatores, o mesmo deve ser deduzido de características relacionadas a reprodução artificial (produção de embriões *in vivo* e *in vitro*) (PEREZ et al., *in press*). Ambas a reprodução natural e artificial, devem inclusive, ser afetadas por fatores genéticos e ambientais semelhantes, uma vez que biotécnicas reprodutivas visam simular as condições de reprodução natural de forma a obter resultados positivos (STROEBECH et al., 2015, BARUSELLI et al., 2015).

A produção de embriões bovinos tem sido implementada com bastante sucesso, consistindo na ferramenta mais reconhecida para favorecer o progresso genético na população. A punção ovariana (OPU) seguida de produção *in vitro* de embriões (IVEP), em especial, tem crescido de forma expressiva na América do Norte e do Sul (apesar de apresentar leve decréscimo na Europa) (STROEBECH et al., 2015). Autores, recentemente, têm sugerido importante aplicação da IVEP nos programas de seleção genômica (KADARMIDEEN et al., 2015).

Assim como tem sido sugerido para o efeito sobre a reprodução natural, é possível presumir que o aumento dos níveis de endogamia pode influenciar características relacionadas à produção de embriões. No entanto, apesar das evidências apontarem para componentes genéticos permeando o sucesso à reprodução artificial, estudos considerando os efeitos da endogamia sobre características relacionadas à produção *in vitro* de embriões são raros ou não existentes.

Portanto, objetivo deste estudo foi estimar efeitos da endogamia da doadora, do reprodutor (cujo sêmen foi utilizado na fertilização *in vitro*) e dos embriões sobre os resultados da produção de oócitos e embriões na população Guzerá de duplo propósito no Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Dados

Informações referentes à produção de oócitos e embriões foram analisadas baseando-se em um arquivo de dados contendo resultados de 5.716 sessões de OPU/IVF (os quais deram origem à 34.696 embriões) realizados em 1.205 doadoras da raça Guzerá, originadas de 20 rebanhos com diferentes propósitos de seleção (corte, leite e duplo propósito), filhas de 262 touros. Os animais tinham entre 1 e 20 anos de idade ao momento da OPU. As sessões foram efetuadas por uma empresa privada de produção de embriões, entre março de 2003 e julho de 2013. O número de sessões por doadora variou de 1

a 49 e os intervalos entre sessões (na mesma doadora) variaram de 7 a 120 dias. Sêmen de um total de 147 touros foi utilizado no procedimento de IVF.

A estatística descritiva dos dados utilizados no desenvolvimento do presente estudo sé apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Mediana, média, desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo para as características analisadas.

Item	Mediana	Média	SD	CV(%)	MIN	MAX
NOV	12,00	15,61	12,74	81,67	1	99
NGI	3,00	3,40	3,62	106,47	0	40
NUNV	8,00	10,79	9,13	84,61	0	87
NDG	3,00	4,94	5,37	108,70	0	60
NCLV	10,00	12,16	10,00	82,23	0	91
NEMB	4,00	6,07	5,67	93,41	0	65
POV (%)	60,00	59,03	13,77	23,32	6,25	100
P _{GI} (%)	20,00	22,97	18,74	81,58	0	100
P _{DG} (%)	16,67	18,46	12,87	56,03	0	100
P _{CLV} (%)	69,23	65,51	19,36	29,55	0	100
P _{EMB} (%)	33,33	34,68	19,68	56,74	0	100
P _{CXE} (%)	50,00	53,76	26,71	49,68	0	100

^a NOV = número de oócitos viáveis, NGI = número de oócitos de grau I, NUNV = número de oócitos inviáveis NDG = número de oócitos degenerados, N_{CVL} = número de embriões clivados, NEMB = número de embriões viáveis produzidos, POV = percentual de oócitos viáveis, P_{GI} = percentual de oócitos de grau I, P_{DG} = percentual de oócitos degenerados, P_{CLV} = percentual de embriões clivados, P_{EMB} = percentual de embriões viáveis e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que tornaram-se embriões viáveis.

A matriz de parentesco utilizada nas análises deste estudo continha 6.850 animais. Acasalamentos realizados *in vitro* (n=5.716) foram incluídos no arquivo de genealogia (cada “acasalamento” como um indivíduo) de forma a estimar os coeficientes de endogamia para os embriões. O arquivo de pedigree completo continha 12.566 entradas de dados. Os coeficientes de endogamia foram calculados para cada animal no arquivo de genealogia com base numa

adaptação do método proposto por Meuwissen e Luo (1992), utilizando o software ASREML (versão 4.0, GILMOUR, 2014).

O efeito do coeficiente de endogamia de três fontes diferentes (doadoras, reprodutores e embriões) sobre características relacionadas a produção *in vitro* de embriões foram testados.

4.2.2 Punção ovariana e produção *in vitro* de embriões

As estruturas foram obtidas por punção ovariana guiada por ultrassom, como descrito por Seneda (2001), seguida de fertilização *in vitro* um dia após aspiração. As sessões de OPU foram realizadas por técnicos de uma empresa de produção de embriões, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Os procedimentos e métodos da punção ovariana e da produção *in vitro* de embriões foram realizados como descrito por Perez et al. (*in press*). Oócitos foram classificados considerando seu grau de viabilidade de acordo com o número de células do cumulus e do citoplasma do complexo cumulus-oócito (graus I, II e III, sem cumulus, expandidos, atresícos ou degenerados), como descritos por Lonergan (1992).

4.2.3 Análise e modelos propostos

Todas as análises foram realizadas no software ASReml (versão 4.0, GILMOUR et al., 2014) e a significância estatística dos fatores incluídos nos modelos foi baseada no teste F de Wald. O presente estudo considerou o efeito do coeficiente de endogamia (da doadora, do reprodutor e dos embriões, separadamente) através da inclusão do mesmo nos modelos como variável contínua e como variável categórica ($F=0$; $0 < F \leq 3,5$; $3,5 < F \leq 7,0$ e $F > 7,0$), como proposto por Mc Parland et al. (2007). A categoria $F=0$ (animais não endogâmicos) foi considerada a categoria de referência. Os componentes linear e quadrático da regressão do coeficiente de endogamia sobre as características estudadas foram considerados quando incluída como variável contínua.

Características relacionadas à produção de oócitos e embriões foram: número de oócitos viáveis (Nov), número de oócitos de grau I (N_{GI}), número de

oócitos inviáveis (N_{UNV}), número de oócitos degenerados (N_{DG}), número de embriões clivados (N_{CLV}) e o número de embriões viáveis produzidos (N_{EMB}). Variáveis percentuais foram, o percentual de oócitos viáveis (P_{OV}), percentual de oócitos de grau I (P_{GI}), percentual de oócitos degenerados (P_{DG}), percentual de embriões clivados (P_{CLV}), o percentual de embriões viáveis (P_{EMB}) e o percentual de embriões clivados que se tornaram embriões viáveis (P_{CXE}). P_{OV} foi calculada como proporção do total de oócitos aspirados, enquanto P_{GI} , P_{CLV} e P_{EMB} foram calculados como proporções de N_{OV} ; P_{DG} foi calculado como proporção de N_{UNV} e P_{CXE} calculado da proporção de N_{EMB} em relação à N_{CLV} .

Para características relacionadas a punção ovariana (N_{OV} ; N_{GI} ; N_{UNV} ; N_{DG} e P_{OV} , P_{GI} , P_{DG}), o seguinte modelo foi proposto:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + e_{ijklmn}, \quad (1)$$

onde y_{ijklmn} representa a característica em análise; μ é o intercepto; hy_i é o efeito fixo de rebanho-ano da OPU ($i=1,2,\dots,108$); bh_j é o efeito fixo do rebanho de nascimento da doadora ($j=1,2,\dots,20$); $season_k$ é a estação da OPU ($k=1$ ou 2); $intOPU_l$ é o efeito fixo das classes de intervalo entre as sessões de OPU ($l=1,2,\dots,6$); $tech_m$ é o efeito fixo do técnico responsável pela OPU ($m=1,2,\dots,7$); βAge e $\beta_2 Age$ representam a idade da doadora à OPU (em meses) como covariável (efeitos linear e quadrático); pe_o é o efeito aleatório de ambiente permanente ($o=1,2,\dots,1205$); e e_{ijklmn} representa o efeito aleatório residual. Também foi incluído o efeito aleatório de animal ($animal_n$) de forma a estimar o componente genético aditivo.

Para características relacionadas a produção de embriões (N_{CLV} , N_{EMB} , P_{CLV} , P_{EMB} e P_{CXE}) o seguinte modelo foi proposto:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + IVFbull_p + e_{ijklmn}, \quad (2)$$

onde $IVFbull_p$ é o efeito aleatório do reprodutor cujo sêmen foi utilizado na IVF (pai dos embriões) ($p = 1, 2, \dots, 147$) e todos os outros efeitos são idênticos aos definidos no modelo 1.

A Tabela 3.2 apresenta para quais características cada fonte de endogamia proposta foi testada. Uma vez que os efeitos relacionados ao reprodutor e ao embrião influenciam o processo apenas a partir do procedimento de fertilização in vitro, os mesmos foram testados apenas sobre características relacionadas à produção de embriões.

De forma a obter estimativas mais acurada para cada característica analisada, variáveis de contagem foram modeladas através de modelos lineares mistos generalizados assumindo distribuição de Poisson e função de ligação Logarítmica ($\eta_i = \ln[\mu_i]$). Da mesma forma, características relacionadas à percentuais foram analisada assumindo distribuição Gaussiana e função de ligação “identidade” ($\eta_i = \mu_i$). As soluções dos efeitos fixos (e respectivos erros padrão) foram, então, transformadas de volta a escala da variável resposta através do inverso da função de ligação ($\mu_i = \exp[\eta_i]$, para a função de ligação logarítmica) de forma a permitir a inferência sobre os valores observados.

Tabela 3.2 Efeitos da endogamia da doadora; do reprodutor e do embrião incluídos em cada variável estudada.

Item ^a	F da Doadora	F do reprodutor	F do embrião
N _{OV}	X	-	-
N _{GI}	X	-	-
N _{UNV}	X	-	-
N _{DG}	X	-	-
N _{CLV}	X	X	X
N _{EMB}	X	X	X
P _{OV}	X	-	-
P _{GI}	X	-	-
P _{DG}	X	-	-
P _{CLV}	X	X	X
P _{EMB}	X	X	X
P _{CXE}	X	X	X

^a N_{OV} = número de oócitos viáveis, N_{GI} = número de oócitos de grau I, N_{UNV} = número de oócitos inviáveis N_{DG} = número de oócitos degenerados, N_{CLV} = número de embriões clivados, N_{EMB} = número de embriões viáveis produzidos, P_{OV} = percentual de oócitos viáveis, P_{GI} = percentual de oócitos de grau I, P_{DG} = percentual de oócitos degenerados, P_{CLV} = percentual de embriões clivados, P_{EMB} = percentual de embriões viáveis e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que tornaram-se embriões viáveis.

4.3 RESULTADOS

A análise da estatística descritiva evidencia uma variação de alta magnitude para as variáveis estudadas. Valores do coeficiente de variação variaram entre 29,55% a 108,70%. A média do coeficiente de endogamia (F) para as doadoras, embriões e reprodutores foi $1,32 \pm 3,13$; $1,95 \pm 2,68$ e $2,08 \pm 2,79$ respectivamente (Tabela 3.3). Considerando apenas animais endogâmicos,

a média de F foi 2,26%; 5,26% e 2,17% respectivamente, para doadoras, reprodutores e embriões. A proporção de indivíduos não endogâmicos foi 29,38%; 42,86% e 35,76% para os mesmos grupos, o que sugere que a endogamia é mais frequentemente praticada em doadoras Guzerá do que em reprodutores ou embriões produzidos *in vitro*. No entanto, o grupo de reprodutores apresentou proporção de 12,38% para indivíduos com F maior que 7%, enquanto para doadoras e embriões, a proporção foi de 8,46% e 4,68%, respectivamente, sobre o total de indivíduos em cada um dos grupos.

A Tabela 3.4 apresenta os coeficientes de regressão para os termos linear e quadrático, assim como as soluções dos efeitos fixos para as categorias de F da doadora sobre características relacionadas à produção de oócitos (N_{OV} , N_{GI} , N_{UNV} e N_{DG}) e de embriões (N_{CLV} e N_{EMB}).

Tabela 3.3 Frequência (N) e percentual (%) dos indivíduos (ou sessões de IVF) de acordo com classes de coeficiente de endogamia.

F (classe)	Embriões IVEP*		Doadoras		Reprodutores	
	N	%	N	%	N	%
F = 0	12.406	35,76	354	29,38	63	42,86
0 > F ≤ 3,5	17.632	50,82	562	46,64	46	31,64
3,5 > F ≤ 7	2.596	14,32	187	15,52	19	13,10
F > 7	1.145	4,68	102	8,46	18	12,38
Total	34.696	100	1.205	100	147	100
F Médio	1,32 ± 3,13		1,95 ± 2,68		2,08 ± 2,79	
F Médio (endogâmicos)	2,17 ± 3,15		2,26 ± 3,39		5,26 ± 4,49	
Máximo	25,24%		30,50%		12,50%	

*N para os dados de embriões IVEP se refere a cada embrião como um indivíduo.

A endogamia da doadora, quando incluída como uma covariável no modelo, apresentou efeito quadrático sobre N_{OV} . Doadoras pertencentes a categorias de F > 7% produziram -0.6955 oócitos viáveis quando comparadas com doadoras não endogâmicas (F=0%). O efeito do F da doadora sobre N_{GI} , quando tratado como variável contínua, foi linear e negativo (-0,0505 para 1% de aumento em F). Quando incluído como variável categórica, doadoras com F > 7% produziram -0,3986 ± 0,2099 oócitos de grau I comparadas às doadoras não endogâmicas. Os efeitos do coeficiente de endogamia da doadora sobre N_{UNV} e

N_{DG} não foram significativas tanto quando incluído como variável discreta, quanto categórica. No entanto, ambos os efeitos apresentaram comportamento similar, em que doadoras na categoria $3,5\% < F \leq 7,0\%$ produziram um maior número de estruturas (para N_{UNV} e N_{DG}) do que vacas não endogâmicas e com $F > 7\%$. Efeito quadrático significativo ($P < 0,05$) também foi detectado para o aumento do F da doadora sobre N_{CLV} . Doadoras no grupo de $0\% < F \leq 7,0\%$ apresentaram maior produção de embriões clivados, mas doadoras com $F > 7,0\%$ produziram em média $-0,1935 \pm 0,1512$ embriões clivados do que animais não endogâmicos. O coeficiente de endogamia da doadora não influenciou N_{EMB} , porém, doadoras com $F > 7\%$ produziram, em média, $-0,1479 \pm 0,2145$ embriões viáveis do que animais não endogâmicos

Tabela 3.4 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia da doadora (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de oócitos e embriões (variáveis de contagem).

Item	N_{OV}	N_{GI}	N_{UNV}	N_{DG}	N_{CLV}	N_{EMB}
F como covariável						
Linear	-0,0616 (0,0725)	-0,0505 (0,0281)	-	-	0,0429 (0,0393)	-
Quadrático	-0,0034 (0,0018)	-	-	-	-0,0030 (0,0015)	-
F como categoria						
$0 < F \leq 3,5$	0,0073 (0,0050)	-0,0091 (0,0110)	-0,1810 (0,2818)	-0,2116 (0,2584)	0,2082 (0,2314)	0,1087 (0,1634)
$3,5 < F \leq 7,0$	-0,1501 (0,0729)	-0,1119 (0,1096)	0,4151 (0,3851)	0,1642 (0,1574)	0,2819 (0,1716)	0,3060 (0,2241)
$F > 7,0$	-0,6955 (0,3802)	-0,3986 (0,2099)	-0,3798 (0,3563)	-0,2682 (0,2950)	-0,1935 (0,1512)	-0,1479 (0,2145)
Wald-F	0,037	0,029	0,057	0,091	0,046	0,327

N_{OV} , número de oócitos viáveis; N_{GI} , número de oócitos de grau I; N_{UNV} , número de oócitos inviáveis; N_{DG} , número de oócitos degenerados; N_{CLV} , número de embriões clivados; e N_{EMB} , número de embriões viáveis produzidos.

Efeitos do coeficiente de endogamia da doadora sobre as características percentuais analisadas no presente estudo são apresentadas na Tabela 3.5. Nenhuma influência do F da doadora foi detectada sobre P_{OV} e, da mesma forma, não foi detectada diferença entre as categorias de F . O mesmo foi observado

para P_{UNV} e P_{DG} . O componente não linear (quadrático) do modelo de regressão foi significativo ($P < 0,05$) sobre P_{GI} , indicando diminuição pronunciada deste tipo de estrutura em doadoras com $F > 3,5\%$ quando comparadas à animais não endogâmicos. Para características relacionadas ao embrião, não foi observado efeito do F da doadora sobre P_{CLV} , porém, o componente quadrático da regressão foi significativo para P_{EMB} . Doadoras endogâmicas apresentaram maior média para o percentual de embriões, em especial, doadoras com F entre 3,5 e 7%, para as quais foi observado $+1,358\% \pm 0,8849\%$ embriões viáveis quando comparadas a doadoras não endogâmicas. Igualmente, efeito não linear do coeficiente de endogamia da doadora para P_{CXE} foi observado. Assim como observado para P_{EMB} , doadoras Guzerá com valores de F entre 3,5% e 7% produziram maiores percentuais $+2,7251 \pm 1,1561$ em relação a doadoras com $F=0\%$) de embriões clivados que concluíram o processo de produção in vitro, tornando-se embriões viáveis.

Tabela 3.5 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia da doadora (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de oócitos e embriões (variáveis percentuais).

Item	P_{OV}	P_{GI}	P_{DG}	P_{CLV}	P_{EMB}	P_{CXE}
F como covariável						
Linear	-	-0,3370 (0,1533)	-	-	-0,0199 (0,0081)	0,5145 (0,0112)
Quadrático	-	0,0057 (0,0078)	-	-	0,3305 (0,1574)	-0,0331 (0,2153)
F como categoria						
$0 < F \leq 3,5$	0,1264 (0,4413)	-0,2581 (0,2553)	-0,3666 (0,4087)	0,2398 (0,6075)	0,6639 (0,6125)	0,5717 (0,8382)
$3,5 < F \leq 7,0$	-0,8307 (0,6107)	-1,853 (0,8241)	0,4088 (0,5662)	-0,4225 (0,8427)	1,358 (0,8449)	2,7251 (1,1561)
$F > 7,0$	0,3255 (0,8592)	-1,800 (1,160)	-0,7801 (0,7969)	1,541 (1,187)	1,255 (1,188)	0,4081 (1,6258)
Wald-F	0,375	0,041	0,347	0,461	0,038	0,117

P_{OV} = percentual de oócitos viáveis; P_{GI} = percentual de oócitos de grau I; P_{DG} = percentual de oócitos degenerados; P_{CLV} = percentual de embriões clivados; P_{EMB} = percentual de embriões viáveis; e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que se transformaram em embriões viáveis.

Não foram detectados efeitos significativos do coeficiente de endogamia do reprodutor (pai dos embriões) sobre a produção *in vitro* de embriões (Tabela 3.6). No entanto, resultado do teste F de Wald (0.064) para o efeito do F do reprodutor sobre N_{CLV} sugere que uma possível significância pode existir. Reprodutores com $3,5\% < F \leq 7,0\%$ e $F > 7,0\%$ apresentaram respectivamente, em média, $-0,6096 \pm 0.6336$ e -0.6329 ± 0.4734 embriões clivados por IVF quando comparados às sessões utilizando sêmen de reprodutores não endogâmicos.

A influência do coeficiente de endogamia dos embriões sobre a produção de embriões por sessão de IVF é apresentada na Tabela 3.7. Tanto quando o coeficiente de endogamia dos embriões foi incluído como covariável, quanto como variável categórica, este foi significativo ($P < 0,05$) ao influenciar N_{EMB} , P_{EMB} e P_{CXE} . O valor de F dos embriões influenciou N_{EMB} de forma não-linear ($\beta_1=0,0108$; $\beta_2=-0,0024$). Quando F foi incluído como variável categórica no modelo, pouca diferença foi encontrada entre embriões não endogâmicos e embriões até 7% F, enquanto acasalamentos cujo $F > 7,0\%$ apresentaram, em média, $-0,4414 \pm 0,2750$ embriões produzidos quando comparados com acasalamentos não endogâmicos. P_{EMB} também apresentou influência do F dos embriões de forma não-linear, não sendo detectada diferença estatística entre categorias de F. Para P_{CXE} , um efeito quadrático do F do acasalamento também foi observado. O mesmo comportamento de pouca variação detectada para valores de F do acasalamento até 7%, enquanto embriões cujo $F > 7\%$ tiveram, em média, $-1,8820\% \pm 1,1651$ embriões clivados que concluíram o processamento *in vitro* em embriões viáveis.

4.4 DISCUSSÃO

Devido à escassez de estudos que consideram o impacto da endogamia sobre características relacionadas à produção *in vitro* de embriões na literatura, a inferência sobre os resultados observados no presente estudo foi também realizada através da análise do comportamento da influência do coeficiente de endogamia sobre características naturais comumente estudadas.

Além disso, como afirmado por Mc Parland et al. (2007), devido ao número reduzido de animais com maiores valores de F, efeitos não lineares detectados

no presente estudo, mesmo que significativos, devem ser interpretados com cautela.

A endogamia da doadora pode ser interpretada de diferentes perspectivas quando no cenário da produção *in vitro* de embriões e no âmbito da genética quantitativa. Quando considerada à produção de oócitos, a endogamia da doadora deve ser entendida como a endogamia do indivíduo influenciando uma característica reprodutiva. Porém, quando consideradas características relacionadas à produção do embrião, a endogamia da doadora pode ser compreendida tanto como endogamia individual (sob a perspectiva da própria doadora), quanto como endogamia materna (sob a perspectiva do embrião). O mesmo se aplica a interpretação da endogamia do reprodutor (pai dos embriões).

4.4.1 Endogamia da doadora

Influências negativas da endogamia sob médias fenotípicas de características reprodutivas foram amplamente reportadas em bovinos (MC PARLAND et al., 2007; HINRICHS; TALLER, 2011). No entanto, estudos considerando efeitos da endogamia sob a produção de embriões são raros.

O efeito do coeficiente de endogamia da doadora sobre Nov foi não linear e, no geral, negativos, conforme o aumento de F. Os resultados indicam que o decréscimo no número de oócitos produzidos é pronunciado em doadoras com $F > 3,5\%$. Estudos anteriores (PEREZ et al., *in press*; MERTON et al., 2009) demonstraram considerável percentual de variância genética para o número de oócitos viáveis produzidos, reportando herdabilidade estimada de 0,19 a 0,25. Considerando esta magnitude de influência genética, é plausível assumir que a redução da variação genética causada pela endogamia pode afetar tal característica. O coeficiente de endogamia da doadora não pareceu influenciar o percentual de oócitos viáveis produzido (P_{OV}).

Tabela 3.6 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia do reprodutor (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção embriões (variáveis percentuais).

Item	N _{CLV}	N _{EMB}	P _{CLV}	P _{EMB}	P _{CXE}
F como covariável					
Linear	-	-	-	-	-
Quadrático	-	-	-	-	-
F como categorias					
0 < F ≤ 3.5	0,0935 (0,1353)	0,1661 (0,2642)	1,2853 (1,1662)	1,3271 (1,4854)	0,4264 (1,0721)
3.5 < F ≤ 7.0	-0,6096 (0,6336)	-0,0256 (0,2925)	-1,2401 (1,5785)	-0,1837 (2,0062)	0,5545 (0,8332)
F > 7.0	-0,6329 (0,4734)	-0,2326 (0,3622)	1,7118 (1,7772)	1,0864 (2,3251)	-1,7620 (1,8982)
Wald-F	0,064	0,327	0,375	0,800	0,557

N_{CVL} = número de embriões clivados; N_{EMB} = número de embriões viáveis; P_{CLV} = percentual de embriões clivados; P_{EMB} = percentual de embriões viáveis; e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que se transformaram em embriões viáveis.

O número de oócitos de grau I produzidos (N_{GI}) foi linearmente (e, negativamente) influenciado (P<0.01) pelo aumento do coeficiente endogamia da doadora. Isso indica que a qualidade dos oócitos pode ser prejudicada quando fêmeas Guzerá endogâmicas são submetidas a punção ovariana. Os efeitos similares observados para P_{GI}, indicam que altos níveis de endogamia da doadora podem diminuir a qualidade dos oócitos produzidos de forma dramática.

A Figura 2.1 mostra os efeitos significativos observados do coeficiente de endogamia da doadora (como variável contínua) sobre características de contagem.

Bezdiček et al. (2015) observavam que vacas da raça Holandesa superovuladas com coeficiente de endogamia superior a 3,1% produziam significativamente mais embriões não fertilizados do que vacas não endogâmicas à produção *in vivo* de embriões. Apesar de não significativos, resultados do presente estudo sugerem maior número de oócitos inviáveis produzido por doadoras com 3,5 < F ≤ 7,0. Isso pode confirmar a ideia de que maiores valores de coeficiente de endogamia podem ocasionar em aumento do número de oócitos inviáveis produzidos por doadora a cada sessão.

Tabela 3.7 Soluções para o efeito do coeficiente de endogamia do embrião (erro padrão entre parênteses) incluído como covariável (efeitos linear e quadrático) e como variável categórica sobre a produção de embriões (variáveis percentuais).

Item	N _{CLV}	N _{EMB}	P _{CLV}	P _{EMB}	P _{CXE}
F como covariável					
Linear	-	0,0108 (0,0076)	-	0,2728 (0,2933)	0,4314 (0,2824)
Quadrático	-	-0,0024 (0,0015)	-	-0,0215 (0,0157)	-0,0252 (0,0092)
F como categorias					
0 < F ≤ 3,5	0,3184 (0,6031)	0,1113 (0,097)	-1,681 (0,7034)	0,3078 (0,8959)	1,2520 (1,040)
3,5 < F ≤ 7,0	0,3215 (0,9594)	0,0984 (0,0685)	-0,6184 (1,2380)	0,8845 (1,495)	1,5102 (1,0082)
F > 7,0	3,126 (1,5301)	-0,4414 (0,2750)	-0,1635 (1,8781)	-1,874 (2,358)	-1,8820 (1,1651)
Wald-F	0,214	0,042	0,174	0,740	0,044

N_{CVL} = número de embriões clivados; N_{EMB} = número de embriões viáveis; P_{CLV} = percentual de embriões clivados; P_{EMB} = percentual de embriões viáveis; e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que se transformaram em embriões viáveis.

O efeito significativo observado do coeficiente de endogamia da doadora sobre N_{CLV} (mas não para N_{EMB}) pode indicar que após a clivagem o componente genético da doadora assume menor influência sobre a capacidade do embrião de manter sua estabilidade no ambiente *in vitro*.

A Figura 2.2 mostra os efeitos significativos observados do coeficiente de endogamia da doadora (como variável contínua) sobre características percentuais.

Por fim, o efeito observado do F da doadora sobre o percentual de embriões viáveis (P_{EMB}), sugerem que os genes envolvidos no momento da clivagem e na viabilidade após clivagem do embrião podem não ser os mesmos. Peixoto et al. (2005) também detectaram efeito positivo da endogamia da doadora sobre a produção de embriões (*in vivo*) em vacas Nelore superovuladas. Por outro lado, Bezdiček et al. (2015) reportaram diferenças significativas para o percentual de embriões viáveis produzidos por animais não endogâmicos (71, 77 %) e animais com coeficiente de endogamia superior a 3,1% (55,13%) em vacas da raça Holandesa superovuladas.

Os resultados conflitantes podem ocorrer devido a diversidade dos critérios de seleção genética aplicados em cada caso específico, levando ao favorecimento de diferentes alelos. Os resultados também podem indicar que o aumento dos níveis de endogamia nem sempre é prejudicial as características reprodutivas. Uma vez que a homozigose ocorra, majoritariamente, em alelos favoráveis à característica em questão, será observado aumento da média fenotípica conforme o aumento do coeficiente de endogamia na população.

Coyral-Castel et al., 2012 compararam haplótipos favoráveis e desfavoráveis em um QTL (quantitative trait loci) localizado no cromossomo 3 (QTL-F-Fert-BTA3) baseando-se em descobertas anteriores (COYRAL-CASTEL et al., 2011), os quais foram associados à fertilidade. Os autores indicaram que a baixa fertilidade em vacas da raça Holandesa pode ocorrer devido à baixa qualidade oocitária, a qual resultaria no desenvolvimento prejudicado do embrião.

Figura 2.1 Efeito do coeficiente de endogamia da doadora sobre variáveis de contagem relacionadas a produção *in vitro* de embriões. NOV = número de oócitos viáveis; NGI = número de oócitos de grau I; NCLV = número de embriões clivados.

Figura 2.2 Efeito do coeficiente de endogamia da doadora sobre variáveis percentuais relacionadas a produção *in vitro* de embriões. P_{GI} = percentual de oócitos de grau I; P_{EMB} = percentual de embriões viáveis e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que se tornaram embriões viáveis.

4.4.2 Endogamia do reprodutor

O componente genético associado à característica relacionadas a fertilidade do touro foram estudados na literatura (SANTANA JR., 2010a; GREDLER et al., 2007) tanto para raças *B. indicus* quanto *B. taurus*. Perez et al. (*in press*) sugeriram efeitos notáveis do reprodutor (pai dos embriões) sobre o total da variação encontrada para características percentuais relacionadas a produção *in vitro* de embriões na raça Guzará. Maximini et al. (2011) reportaram sinais de depressão endogâmica sobre a qualidade do sêmen bovino. Baseando-se em resultados de estudos anteriores, era esperado que os níveis de endogamia do reprodutor pudessem influenciar os resultados da produção de embriões *in vitro*. No entanto, não foi detectado efeito do coeficiente de endogamia do reprodutor sobre as características analisadas no presente estudo. Este resultado torna claro que ambos os gametas (espermatozoides e oócitos) sofrem influência de fatores distintos durante o processo de produção *in vitro* de embriões, ou que ambos são afetados de forma não simétrica por fatores idênticos. O número reduzido de reprodutores cujo sêmen foi utilizado à IVF (147) no banco de dados pode ser um fator causador da ausência de efeitos significativos. Outra explicação pode estar na própria tecnologia de produção *in*

vitro de embriões. Uma vez que biotecnologia visa simular os processos ocorridos no trato reprodutivo da fêmea, efeitos causados por deficiências na fertilidade do touro podem ser minimizados.

Apesar de não significativas, as medias observadas das características estudadas para reprodutores com $F > 7\%$ foram consideravelmente negativas, sendo -0,6329; -0.2326 e -1.7620% para N_{CLV} , N_{EMB} e P_{CXE} , respectivamente, quando comparados à resultados de reprodutores não endogâmicos.

Estudos posteriores objetivando melhor explicar a influência da endogamia do reprodutor sobre a produção *in vitro* de embriões poderiam ajudar a elucidar sobre papel da integridade reprodutiva do macho nos resultados obtidos à reprodução artificial de bovinos.

4.4.3 Endogamia do embrião

As soluções dos efeitos estimados para categorias de F (dos embriões) sugerem que coeficientes de endogamia superiores a 7% são prejudiciais aos resultados de N_{EMB} , P_{EMB} e P_{CXE} . Portanto, deve haver uma associação entre a endogamia do embrião e sua capacidade de sobreviver aos procedimentos e ao ambiente inerente ao processamento *in vitro*. Van Raden et al. (2002) reportaram impacto negativo do aumento do coeficiente de endogamia do embrião nas taxas de concepção e sobrevivência aos 70 dias após inseminação. De forma similar, Cassel et al. (2003) observaram notável depressão endogâmica na taxa de não retorno aos 70 dias na raça Jersey, característica fortemente associada à estabilidade do embrião. A taxa de não-retorno é uma característica altamente correlacionada com a capacidade de sobrevivência do embrião. Da mesma forma, quando analisada sob a perspectiva do embrião, N_{EMB} e P_{CXE} podem ser igualmente compreendidas como medidas da capacidade de sobrevivência do embrião ao ambiente *in vitro*. Considerando o exposto, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que existe associação entre o coeficiente de endogamia do embrião e sua estabilidade aos processos reprodutivos *in vivo* e *in vitro*.

A ausência de efeito significativo ($P > 0,05$) da endogamia do embrião Guzerá sobre P_{CLV} , quando compreendida conjuntamente aos resultados reportados por Perez et al. (*in press*) de herdabilidade extremamente baixa ($0,01 \pm 0,005$) para esta característica (também na raça Guzerá) conduz para uma importante concepção. A capacidade de clivagem do embrião em ambiente desafiador (como é o caso do ambiente *in vitro*) foi, provavelmente, indiretamente selecionado através das condições ambientais extremas impostas a populações de animais *Bos indicus* sob clima tropical, levando à situação onde alelos que favoreciam a clivagem de embriões sob condições extremamente desfavoráveis fossem fixados na população Guzerá. Essa hipótese se reforça quando consideramos a herdabilidade estimada por Merton et al. (2009) para P_{CLV} de $0,07 \pm 0,02$ em animais da raça Holandesa criados em clima temperado, explicitando maior variação de origem genética nesta população.

A Tabela 3.7 apresenta os efeitos significativos da endogamia dos embriões sobre a produção *in vitro* de embriões quando F foi incluída como variável contínua ou categórica.

Figura 2.3 Efeito do coeficiente de endogamia do embrião sobre a produção *in vitro* de embriões. P_{EMB} = percentual de embriões viáveis e P_{CXE} = percentual de embriões clivados que se tornaram embriões viáveis; e N_{EMB} = número de embriões viáveis produzidos.

Tiezzi et al. (2015) estimaram componentes genéticos para a sobrevivência do embrião *in vivo* usando dados de rebanhos leiteiro da raça Brown Swiss na Itália. Os autores reportaram herdabilidades de 0,119 e 0,054 para prenhes por serviço e para a taxa de não retorno após 56 dias da inseminação, sugerindo que existe variação genética permeando a sobrevivência do embrião aos processos reprodutivos naturais.

Bamber et al. (2009) estudaram aspectos genéticos da perda de gestação em gado de leite. Os autores observaram uma maior proporção do total da variação oriundo do componente genético do embrião do que de do componente genético de sua mãe. Esse resultado reforça a percepção de que o mérito genético do embrião possui papel notável em sua capacidade de sobrevivência e, indiretamente, confirmam os resultados observados no presente estudo.

4.5 CONCLUSÃO

Tanto efeitos favoráveis quanto desfavoráveis do aumento dos níveis de endogamia foram observados sobre a produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. Altos níveis de endogamia na doadora podem prejudicar o desempenho de fêmeas à produção de oócitos e embriões. No entanto, o aumento do coeficiente de endogamia da doadora afetou de forma positiva o percentual de embriões viáveis produzidos. A endogamia do reprodutor (pai dos embriões) não pareceu influenciar os resultados da produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. Apesar dos valores observados não representarem uma diminuição drástica do número e/ou percentual de estruturas produzidas, coeficientes de endogamia acima de 7% apresentaram efeito negativo sobre as características estudadas. Valores de F acima de 7% para o embrião foram associados à diminuição da sua capacidade de sobrevivência ao processo de produção *in vitro*. Altos níveis de endogamia devem, portanto, ser evitados no momento da escolha de fêmeas como doadoras e no planejamento dos acasalamentos à serem realizados em programas de produção de embriões.

4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BAMBER, R.L.; SHOOK, G.E.; WILTBANK, M.C.; SANTOS, J.E.; FRICKE, P.M. Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 92(11):5739-53, 2009.

BARUSELLI, P.S.; VIEIRA, L.M.; BATISTA, E.O.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; MARTINS, C.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Updates on embryo production strategies. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.375-382, 2015.

BEZDÍČEK, J.; STÁDNÍK, L.; MAKAREVICH, A.; KUBOVIČOVÁ, E.; LOUDA, F.; HEGEDÜŠOVÁ, 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.

CASSEL, B.G.; ADAMEC, V.; and PEARSON, R.E. Effect of incomplete pedigrees on estimates of inbreeding and inbreeding depression for days to first service and summit milk yield in Holsteins and Jerseys. **Journal of Dairy Science**, 81:2299-2305, 2003.

COYRAL-CASTEL, S.; RAMÉ, C.; MONNIAUX, D.; FRÉRET, S.; FABRE-NYS C.; FRITZ, S.; MONGET, P.; DUPONT, F.; DUPONT, J. Ovarian parameters and fertility of dairy cows selected for one QTL located on BTA3. **Theriogenology**, 75:1239-1250, 2011.

COYRAL-CASTEL, S.; BRISARD, D.; TOUZE, J.L.; DUPONT, M.; RAME, C.; UZBEKOYA, S.; DUPONT, J. Analysis of in vivo oocyte maturation, in vitro embryo development and gene expression in cumulus cells of dairy cows and heifers selected for one fertility quantitative trait loci (QTL) located on BTA3. **Theriogenology**, 77(9):1822-33, 2012.

CROQUET, C.; MAYERES, P.; GILLON, A., HAMMAMI, H.; SOYUERT, H.; VANDERICK, S. and GENGLER, N. Linear and curvilinear effects of inbreeding on production traits for Walloon Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, 90,465-471, 2007.

CROW, J. F. and KIMURA, M. An Introduction to Population Genetics Theory. Harper & Row, New York, 1970.

DAI, S.; WANG, C.; WANG, Z.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; Q, NA.; LI, J.; WANG, R. Inbreeding and its effects on fleece traits of Inner Mongolia cashmere goats. **Small Ruminant Research**, volume 128, pages 50-53, 2015.

DICKERSON, G.E. Experimental evaluation of selection theory in poultry. In: Genetics Today, **Proceedings of the International Congress of Genetics**, 11. The Hague, Holand, p.747- 761, 1963.

FALCONER, D.S. and MACKAY, T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group, Essex, UK, 1996.

GIPSON, T.A. Preliminary observations: inbreeding depression in endangered *Eremostachys superb* Royle ex Benth. (Labiate) in Dehra Dun population, India. *Taiwania* 49(4), 237-249, 2002.

GONZÁLEZ-RECIO, O., LÓPEZ DE MATURANA, E. and GUTIÉRREZ, J.P. Inbreeding depression of female fertility and calving ease in Spanish dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90, 5744-5752, 2007.

GREDLER, B.; FUERST, C.; FUERST-WALTL, B.; SCHWARZENBACHER, H.; and SÖLKNER, J. Genetic Parameters for Semen Production Traits in Austrian Dual-Purpose Simmental Bulls. **Reproduction in Domestic Animals**. Volume 42, Issue 3, pages 326–328, 2007.

HINRICHS, D. and THALLER, G. Pedigree analysis and inbreeding effects on calving traits in large dairy herds in Germany. **Journal of Dairy Science**, 94:4726–4733, 2011.

KADARMIDEEN, H.N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y.F.; STRØEBECH, L.; BARUSELLI, P.S.; MEIRELLES, F.V.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; FERRAZ, J.B.S.; NOGUEIRA, M.F. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.389-396, 2015.

KEARNEY, J. F.; WALL, E.; VILLANUEVA, B. and COFFEY, M. P. Inbreeding trends and application of optimized selection in the UK Holstein population. **Journal of Dairy Science**, 87:3503–3509, 2004.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and cultivation of bovine follicular oocytes. Doctoral thesis, National University of Ireland, 1992.

MAXIMINI, L.; FUERST-WALTL, B.; GREDLER, B.; BAUMUNG, R. Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose Simmental bulls. **Reproduction of Domestic Animals**, 46(1):e102-4, 2011.

MC PARLAND, S.; KEARNEY, J.F.; RATH, M. and 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.

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**, Vol. 72, Issue 7, p885–893, 2009.

MEUWISSEN, T.H.E. and Luo, Z. Computing inbreeding coefficients in large populations. **Genetics Selection Evolution**. 24:305–313, 1992.

OROZCO-LUCERO, E. and SIRARD, M.A. Molecular markers of fertility in cattle oocytes and embryos: progress and challenges. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.183-194, Jul./Sept. 2014

PEIXOTO, M.G.C.D.; PEREIRA, C.S.; BERGMANN, J.A.G.; PENNA, V.M.; FONSECA, C.G. Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. **Theriogenology**, Vol. 62, Issue 8, p1459–1464, 2004.

PEREZ, B.C; PEIXOTO, M.G.C.D.; BRUNELI, F.T.; RAMOS, P.V.B.; BALIEIRO, J.C.C. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, *in press*.

PANETTO, J.C.C.; GUTIÉRREZ, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; CUNHA, D.G. and 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.

ROKOU EI, M.; VAEZ TORSHIZI, R.; MORADI-SHAHRBABA K, M.; SARGOLZAEI, M.; SØRENSEN, A.C. Monitoring inbreeding trend and inbreeding depression for economically important traits of Holstein cattle in Iran. **Journal of Dairy Science**, 93(7): 3294-3302, 2010.

SANTANA JÚNIOR, M.L.; LOPES, P.S.; VERNEQUE, R.S.; PEREIRA, R.J.; LAGROTTA, M.R.; PEIXOTO, M.G.C.D. Genetic parameters for reproductive traits of dairy Gyr breed males and females. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1717-1722, 2010a.

SANTANA JÚNIOR, M.L; OLIVEIRA, P.S.; PEDROSA, V.B.; ELER, J.P.; GROENEVELD, E.; FERRAZ, J.B.S. Effect of inbreeding on growth and reproductive traits of Nellore cattle in Brazil. **Livestock Science**, Volume 131 , Issue 2 , 212 – 217, 2010b.

SENEDA, M.M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vitro de ovócitos bovinos. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil, 2001.

SEWALEM, A.; KISTEMAKER, G. J.; MIGLIOR, F. and VAN DOORMAAL, B. J. Analysis of inbreeding and its relationship with functional longevity in Canadian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 89:2210–2216, 2006.

SØRENSEN, A. C.; SØRENSEN, M. K. and BERG, P. Inbreeding in Danish dairy cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, 88:1865–1872, 2005.

STRØEBECH, L.; MAZZONI, G.; PEDERSEN, H.S.; FREUDE, K.K.; KADARMIDEEN, H.N.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.465-472, 2015.

THOMPSON, J.R.; EVERETT, R.W. and HAMMERSCHMIDT, N.L. Effects of inbreeding on production and survival in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, 83, 1856-1864, 2000.

TIEZZI, F.; MALTECCA, C.; CECCHINATO, A.; BITTANTE, G. Comparison between different statistical models for the prediction of direct genetic component on embryo establishment and survival in Italian Brown Swiss dairy cattle. **Livestock Science**, Volume 180, Pages 6–13, 2015.

VAN RADEN, P.M. and MILLER, R.H. Effects of non additive genetic interactions, inbreeding, and recessive defects on embryo and fetal loss by seventy days. **Journal of Dairy Science**. 89, 2716-2721, 2006.

CHAPTER 4. Comparação de modelos linear, Poisson e binomial negativo para análise genética da produção *in vitro* de embriões em vacas da raça Guzerá em abordagem frequentista.

B.C. Perez¹, M.G.C.D. Peixoto², F.F. Silva⁴, R. Ventura^{5,6,7}, F.A.T. Bruneli², J.P. Eler⁵ e J.C.C. Balieiro³

¹Programa de Pós Graduação – Qualidade e produtividade animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

²Embrapa Gado de Leite, CNPGL, Juiz de Fora, MG, Brasil

³Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

⁴Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

⁵Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia, Departamento de Ciências Básicas, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil

⁶Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá.

⁷Beef Improvement Opportunities, Elora, Ontario, Canadá.

RESUMO. Diferentes estratégias têm sido aplicadas na modelagem da produção de embriões; no entanto, nenhuma investigação crítica foi realizada na literatura. O objetivo do presente estudo foi acessar a qualidade do ajuste e a capacidade preditiva de diferentes modelos para estudar sua adequação à análise genética sob o algoritmo de máxima verossimilhança restrita (REML). A comparação envolveu a aplicação de quatro modelos hierárquicos frequentistas assumindo à variável resposta as seguintes distribuições: Gaussiana (variável transformada - LOG - e não transformada - LIN), Poisson (POI) e binomial negativa (NGB). Características de contagem analisadas foram: número de oócitos viáveis (NOV), número de oócitos grau I (NGI); número de oócitos atresícos (NAT); número de oócitos degenerados (NDG); número de embriões clivados (NCLV) e número de embriões viáveis (NEMB) produzidos. A herdabilidade variou entre 0,16-0,22 (NOV); 0,07-0,12 (NGI); 0,03-0,06 (NAT); 0,11-0,17 (NDG); 0,13-0,17 (NCLV); 0,10-0,16 (NEMB) dependendo do modelo aplicado. Ampla variação foi observada para o efeito de ambiente permanente e, conseqüentemente, a repetibilidade estimada variou entre 0,53-0,69 (NOV); 0,21-0,37 (NGI); 0,19-0,27 (NAT); 0,27-0,48 (NDG); 0,42-0,59 (NCLV); 0,34-0,50 (NEMB), onde modelos POI detectaram maior repetibilidade para todas as variáveis estudadas. Modelo POI também

apresentaram menor valor do erro quadrático médio e do erro quadrático médio de predição (mediante validação cruzada) do que outros modelos testados. Modelos NGB tiveram desempenho similar aos modelos LIN; enquanto modelos LOG exibiram maior viés dentre os modelos propostos. Valores genético estimados na população foram altamente correlacionados entre os modelos. O número de animais repetidos entre os 10% maiores valores genéticos apresentou menor similaridade. Os resultados sugerem que, sob o método REML, modelos Poisson são mais adequados à análise genética da produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá.

Palavras chave: comparação de modelos, fertilização *in vitro*, modelos mistos generalizados, punção ovariana, REML, zebuínos

ABSTRACT. Many different strategies have been applied for modeling embryo production traits; however, no critical investigation was performed in the literature. The objective of the present study was to assess the goodness of fit and predictive ability of different models in order to investigate their adequacy for genetic analysis under REML algorithm. Comparison involved fitting four hierarchical frequentist models assuming the response variable follows different distributions: Gaussian (transformed - LOG - and untransformed variables – LIN -), Poisson (POI) and Negative Binomial (NGB). Count traits analyzed were: number of viable oocytes (N_{OV}), number of grade I oocytes (N_{GI}); number of atresic oocytes (N_{AT}); number of degenerated oocytes (N_{DG}); number of cleaved embryos (N_{CLV}) and number of viable embryos produced (N_{EMB}). Heritability varied from 0.16-0.22 (N_{OV}); 0.07-0.12 (N_{GI}); 0.03-0.06 (N_{AT}); 0.11-0.17 (N_{DG}); 0.13-0.17 (N_{CLV}); 0.10-0.16 (N_{EMB}) depending on the model applied. Major variation was observed for the permanent environment effect and, consequently, the repeatability estimated varied from 0.53-0.69 (N_{OV}); 0.21-0.37 (N_{GI}); 0.19-0.27 (N_{AT}); 0.27-0.48 (N_{DG}); 0.42-0.59 (N_{CLV}); 0.34-0.50 (N_{EMB}), where POI models detected higher repeatability for each investigated trait. POI models also had lower mean squared error and mean squared error of prediction (upon cross-validation) than all other models tested. NGB models performed very similar to LIN models (without variable transformation); while LOG models exhibited the

highest bias. Donors' estimated breeding values were highly correlated between models. The number of repeated animals on the 10% higher EBVs showed lower similarities. Results suggest that, under REML method, Poisson models are more adequate for genetic analysis of *in vitro* embryo production traits in Guzera cattle.

Key words: generalized linear models; *in-vitro* fertilization; model comparison, ovum-pick up, REML, zebu cattle

5.1 INTRODUÇÃO

Bioteecnologias reprodutivas são, reconhecidamente, as ferramentas centrais para o progresso genético desde a introdução da inseminação artificial (BARUSELLI et al., 2015) em rebanhos bovinos. Desde então, o desenvolvimento de novas tecnologias, como a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET), e a produção *in vitro* de embriões (IVEP) permitiram à criadores aumentar a pressão de seleção e reduzir intervalos de geração (BOLS et al., 2015), mudando drasticamente o mercado de genética bovina. Além disso, programas de melhoramento genético tem se beneficiado da possibilidade de multiplicar animais de forma a acelerar a estimação do mérito genético dos indivíduos com um mínimo de confiabilidade.

Raças *Bos indicus* apresentam excelente desempenho à IVEP (RODRIGUES, 2015; VIANA et al., 2012) e este é considerado um fator relevante para o crescimento da punção ovariana seguida de fertilização *in vitro* ocorrido no Brasil nos últimos 7 anos (KADARMIDEEN, 2015).

A análise genética de características relacionada à produção *in vitro* de embriões pode auxiliar no aprimoramento dos resultados de OPU/IVEP, assim como na compreensão do grau de associação genética entre estas e características produtivas e reprodutivas comumente incluídas como critério de seleção em programas de melhoramento.

Características de interesse no processo de produção de embriões bovinos são frequentemente definidas por contagens ou proporções entre duas variáveis de contagem. As estratégias mais adotadas para modelar resultados da produção de embriões na literatura foram através de transformação da

variável (MERTON et al., 2009; PEIXOTO et al., 2004), pressuposição de distribuição Gaussiana da variável resposta (TONHATI et al., 1999) e mediante utilização de modelos lineares mistos generalizados (KÖNIG et al., 2007). Dados de contagem são comumente modelados assumindo-se distribuições de Poisson (RODRIGUES-MOTTA et al., 2007, KÖNIG et al., 2007, VAZQUEZ 2009;2012, AYRES et al., 2012; ABDOLLAHI-ARPANAHI et al., 2013; VENTURA et al., 2015) ou binomial negativa (TEMPELMAN; GIANOLA, 1999; VARONA e SØRENSEN, 2010) para a variável que se deseja explicar. Estudos sugeriram a presença de componente genético influenciando a produção de embriões em fêmeas bovinas, porém, nenhuma investigação crítica acerca da qualidade de adequação dos modelos propostos foi reportada.

Modelos mistos lineares (LMM) são amplamente implementados na genética quantitativa (no âmbito do melhoramento animal), porém, sua utilização para modelagem de variáveis discretas é questionável (GIANOLA; ROSA, 2015) se não realizada, anteriormente, adequada transformação da variável estudada. No entanto, a aplicação do LMM para variáveis discretas pode ser uma abordagem interessante seja para testar a robustez dos algoritmos, seja para acessar o nível de viés gerado por essa aplicação em problemas enfrentados no melhoramento animal.

Modelos lineares mistos generalizados (GLMM) (MC CULLAUGH; NELDER, 1983) foram propostos a partir da percepção de que diversas variáveis de interesse para a estatística seguem distribuições não-Gaussianas. Estes modelos são extensões do modelo linear misto geral e fazem uso de uma função de ligação de forma a incluir os termos aleatórios em um preditor linear.

Apesar do desenvolvimento de novos métodos de estimação de componentes de variância e do surpreendente aumento do poder computacional ocorrido nas últimas décadas, o método de máxima verossimilhança restrita (REML) é, ainda, amplamente utilizado em programas de melhoramento genético no mundo (THOMPSON, 2008).

O objetivo do presente estudo foi acessar a qualidade de adequação e capacidade de predição de diferentes modelos hierárquicos de forma a investigar se existe evidência estatística da variação genética para características relacionadas à produção in vitro de embriões. A análise estatística envolveu a

adequação de quarto modelos hierárquicos (em abordagem frequentista) assumindo que a variável resposta segue as seguintes distribuições: Gaussiana, Poisson e binomial negativa.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Dados

O banco de dados continha um total de 5.716 registros de aspiração oocitária e fertilização *in vitro*, realizadas em 1.205 fêmeas doadoras da raça Guzerá. As sessões ocorreram entre março de 2003 e julho de 2013, em 20 rebanhos puros. Os procedimentos foram realizados por técnicos de uma empresa de produção de embriões localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. A idade dos animais variou entre 1 e 20 anos de idade no momento da OPU. O arquivo de pedigree usado para determinar o relacionamento genético existente entre as 1.205 doadoras incluiu um total de 8.670 indivíduos. O número de sessões realizadas por doadora variou entre 1 e 49; e os intervalos entre as sessões de OPU na mesma doadora variaram entre 7 e 120 dias. Foi utilizado sêmen de 147 reprodutores Guzerá diferentes nos procedimentos de IVEP.

As características analisadas no presente estudo foram: número de oócitos viáveis (N_{OV}), número de oócitos de grau I (N_{GI}); número de oócitos atrésicos (N_{AT}); número de oócitos degenerados (N_{DG}); número de embriões clivados (N_{CLV}) e o número de embriões viáveis (N_{EMB}). Componentes de variância foram estimados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML), através do software ASREML (4.0, GILMOUR et al., 2014), por meio de modelos univariados. A Tabela 4.1 mostra a estatística descritiva dos dados analisados neste estudo.

Tabela 4.1 Número de observações (N), medianas, médias, desvio padrão (SD), valores de mínimo e máximo e a frequência de zeros encontrada para as características analisadas.

Item	Mediana	Média	SD	CV(%)	Min.	Max.	Nº de zeros
N _{OV}	12,00	15,61	12,74	81,67	1	99	0
N _{GI}	3,00	3,40	3,62	106,47	0	40	1.105
N _{AT}	1,00	2,07	3,34	161,35	0	50	2.286
N _{DG}	3,00	4,94	5,37	108,70	0	60	546
N _{CLV}	10,00	12,16	10,00	82,23	0	91	9
N _{EMB}	4,00	6,07	5,67	93,41	0	48	106

N_{OV} = número de oócitos viáveis; N_{GI} = número de oócitos de grau I; N_{AT} = número de oócitos atresícos; N_{DG} = número de oócitos degenerados; N_{CLV} = número de embriões clivados; N_{EMB} = número de embriões viáveis.

5.2.2 Punção ovariana e produção *in vitro* de embriões

As estruturas foram obtidas por punção ovariana guiada por ultrassom, como descrito por Seneda (2001), seguida de fertilização *in vitro* um dia após aspiração. As sessões de OPU foram realizadas por técnicos de uma empresa de produção de embriões, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Os procedimentos e métodos da punção ovariana e da produção *in vitro* de embriões foram realizados como descrito por Perez et al. (*in press*). Oócitos foram classificados considerando seu grau de viabilidade de acordo com o número de células do cumulus e do citoplasma do complexo cumulus-oócito (graus I, II e III, sem cumulus, expandidos, atresícos ou degenerados), como descritos por Lonergan (1992).

5.2.3 Modelos estatísticos

Para cada característica incluída nas análises propostas nesse estudo, foram testados quatro modelos (animal), incluindo dois lineares mistos e dois lineares mistos generalizados: o primeiro assumiu distribuição Gaussiana da variável resposta sem transformação (LIN); o segundo assumiu distribuição

Gaussiana da variável resposta sob transformação logarítmica ($\log_{10}[x+1]$) (LOG); o terceiro considerou um modelo GLMM assumindo distribuição de Poisson; e o quarto um modelo GLMM assumindo distribuição binomial negativa (NGB). As funções de ligação usadas neste estudo foram a logarítmica ($\eta_i = \ln[\mu_i]$) para POI e NGB; e identidade ($\eta_i = \mu_i$) para LIN e LOG, onde η_i é o preditor linear e $\ln$ é o logaritmo natural.

A distribuição negative binomial foi incluída neste estudo por ser uma extensão da distribuição de Poisson (TEMPELMAN; GIANOLA, 1996) e como tal, tem sido utilizada para modelar variáveis de contagem. No entanto, resíduos na distribuição binomial negativa são capazes de absorver variação Poisson extra (MATOS et al., 1997). As definições de função de variância para as distribuições de Poisson ($v = \mu$) e negativa binomial ($v = \mu + \frac{\mu^2}{\phi}$) revelam um parâmetro adicional na segunda (ϕ), o qual “controla” a escala de variação. A sobredispersão ocorre quando a variância amostral é significativamente superior à média ($v > \mu$), resulta em possível subestimação dos parâmetros. Na prática, o parâmetro phi (ϕ) permite ao modelo negativo binomial melhor se adequar a variáveis de contagem superdispersas do que a distribuição de Poisson padrão.

Independente da distribuição (Gaussiana, Poisson ou negativa binomial) assumida, os efeitos considerados nos modelos foram idênticos para todas as análises realizadas no presente estudo.

Para características relacionadas a punção ovariana (N_{OV} , N_{GI} , N_{AT} e N_{DG}), o seguinte modelo foi proposto:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + e_{ijklmn}, \quad (1)$$

onde y_{ijklmn} representa a característica em análise; μ é o intercepto; hy_i é o efeito fixo de interação rebanho-ano da OPU ($i=1,2,\dots,108$); bh_j é o efeito fixo do rebanho de nascimento da doadora ($j=1,2,\dots,20$); $season_k$ é a estação da OPU ($k=1$ or 2); $intOPU_l$ é o efeito fixo das classes de intervalo entre as sessões de OPU ($l=1,2,\dots,6$); $tech_m$ é o efeito fixo do técnico responsável pela OPU ($m=1,2,\dots,7$); βAge e $\beta_2 Age$ representam a idade da doadora à OPU (em meses)

como covariável (efeitos linear e quadrático); pe_o é o efeito aleatório de ambiente permanente ($o= 1,2...1205$); e e_{ijklmn} representa o efeito aleatório residual. Também foi incluído o efeito aleatório de animal ($animal_n$) de forma a estimar o componente genético aditivo.

Para este modelo (1), a análise univariada em notação matricial foi:

$$y = Xb + Zu + Spe + e,$$

onde y = vetor de observações; b = vetor de efeitos fixos; u = vetor do efeito genético de animal; pe = vetor de efeito aleatório de ambiente permanente; e = vetor de efeito residual, e X , Z e S são as matrizes de incidência relacionando os registros aos efeitos fixos e aleatórios.

É assumido que:

$$\text{var} \begin{bmatrix} u \\ pe \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} gA & 0 & 0 \\ 0 & I\sigma_{pe}^2 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix},$$

onde g é a variância genética aditiva, A é matriz de relacionamentos, I representa a matriz identidade; σ_{pe}^2 é a variância de ambiente permanente e σ_e^2 é a variância residual.

Para características relacionadas a produção de embriões (N_{CLV} , N_{EMB}) o seguinte modelo foi proposto:

$$y_{ijklmn} = \mu + hy_i + bh_j + season_k + intOPU_l + tech_m + \beta Age + \beta_2 Age + animal_n + pe_o + IVFbull_p + e_{ijklmn}, \quad (2)$$

onde $IVFbull_p$ é o efeito aleatório do reprodutor cujo sêmen foi utilizado na IVF (pai dos embriões) ($o= 1,2, ...147$) e todos os outros efeitos são idênticos aos definidos no modelo 1.

Para este modelo (2), a análise univariada em notação matricial foi:

$$y = Xb + Zu + Spe + Wsi + e,$$

onde si = efeito aleatório do reprodutor cujo sêmen foi usado na IVEP; e os demais elementos são idênticos ao modelo 1.

$$\text{Var} \begin{bmatrix} u \\ pe \\ b \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} gA & 0 & 0 & 0 \\ 0 & I\sigma_{pe}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_b^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

5.2.4 Estimativas de herdabilidade

Herdabilidades (h^2) para os diferentes modelos foi calculada da seguinte forma:

Para características relacionadas a produção de oócitos:

$$\text{LIN; LOG and NGB, } h^2 = \frac{\alpha_a^2}{\alpha_a^2 + \alpha_{pe}^2 + \alpha_e^2};$$

$$\text{POI, } h_{\eta}^2 = \frac{\alpha_a^2}{\alpha_a^2 + \alpha_{pe}^2 + \phi\lambda^{-1}}$$

Para características relacionadas a produção de embriões:

$$\text{LIN; LOG and NGB, } h^2 = \frac{\alpha_a^2}{\alpha_a^2 + \alpha_{pe}^2 + \alpha_b^2 + \alpha_e^2};$$

$$\text{POI, } h_{\eta}^2 = \frac{\alpha_a^2}{\alpha_a^2 + \alpha_{pe}^2 + \alpha_b^2 + \phi\lambda^{-1}},$$

onde α_a^2 , α_{pe}^2 , α_b^2 e α_e^2 são as variâncias estimadas de animal, ambiente permanente, touro usado na IVEP e residual, respectivamente. Uma vez que, em modelos GLMM Poisson, a soma dos componentes de variância não corresponde ao total da variação, a herdabilidade (sendo h_{η}^2 a herdabilidade na escala η ;) para os modelos POI foi calculada como proposto por Foulley e

Gianola (1997). O λ_i é o parâmetro inerente a distribuição de Poisson e foi avaliado na média de cada característica. A o parâmetro de dispersão (ϕ) foi incluído de forma a acomodar a possível sobredispersão (TEMPELMAN; GIANOLA, 1996).

5.2.5 Comparação dos modelos

Os modelos propostos foram comparados pelos seguintes critérios:

5.2.5.1 Erro quadrático médio (MSE)

$$MSE = n^{-1} \sum_{ijklmnop} (y_{ijklmnop} - \hat{y}_{ijklmnop})^2$$

onde $\hat{y}_{ijklmnop}$ é o vetor dos valores preditos; $y_{ijklmnop}$ é o valor da observação correspondente, e n é o número de observações.

Para LOG, $\hat{y}_{ijklmnop}$ foi novamente transformado para a escala original (contagem de oócitos/embriões) por $10^{\hat{y}_{ijklmnop} - 1}$. Devido aos valores preditos estarem em diferentes escalas nos diferentes modelos, estes foram transformados de volta à escala original a partir do inverso da função de ligação, sendo para o modelo de Poisson e binomial negativo, $\hat{y} = \exp(\hat{\eta})$; e para o modelo linear $\hat{y} = \hat{\eta}$.

5.2.5.2 Capacidade de predição

A validação cruzada (3-fold) foi procedida de forma a acessar a capacidade preditiva dos modelos propostos. O banco de dados completo foi dividido em três partes de forma aleatória, com a restrição de que em cada uma das subdivisões, todos os rebanhos foram representados. Para a validação cruzada, 2 das 3 subdivisões foram usadas para adequação e predição (conjunto de treinamento) e a capacidade preditiva foi testada na subdivisão restante (conjunto de teste). Os componentes de variância, soluções dos efeitos fixos e

aleatórios de cada modelo foram re-estimados para cada um dos três conjuntos de treinamento.

O erro quadrático médio de predição foi usado para comparação dos modelos propostos como definido em:

$$MSEP = n^{-1} \sum_{i=1}^n (y_{ijklmnop} - \hat{y}_{ijklmnop}^{\varphi})^2$$

onde $y_{ijklmnop}$ o vetor de valores preditos na φ ésima subdivisão, $\hat{y}_{ijklmnop}^{\varphi}$ é o valor predito baseado nos dados oriundos das duas outras subdivisões; e n é o número de observações no conjunto de teste. Uma vez que valores preditos para LOG estavam em escala diferente, estes foram transformados de volta à escala original por meio do inverso da função de ligação.

5.2.5.3 Correlação de Spearman entre os valores genéticos estimados (EBVs)

O coeficiente foi calculado como:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

onde d_i é a diferença entre cada posto de valor correspondente a cada animal com valor genético estimado para determinado par de rankings; e n é o número de pares de valores.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Estatística descritiva e análise de efeitos fixos

Das 1,205 doadoras contidas no banco de dados, 13 tinham 1 anos de idade ou menos; 324 tinham entre 1 e 3 anos de idade; 317 tinham entre 3 e 6

anos de idade e 551 tinham mais de 6 anos de idade à primeira sessão de OPU. Todas as características analisadas seguiam distribuições próximas à Poisson, porém a relação média-mediana e o coeficiente de variação explicitam as diferenças entre as mesmas. O coeficiente de variação variou entre 81,67% e 161,35%. A frequência de zeros variou significativamente entre as variáveis estudadas, N_{AT} e N_{GI} apresentaram maior número de zeros, sendo 2.286 e 1.105 respectivamente, valores os quais representam 40% e 19.33% do total do número de observações ($n=5.716$). N_{OV} apresentou a menor frequência de zeros (0). O valor de probabilidade (P-valor) estimados para os efeitos fixos não variaram significativamente entre os modelos. O efeito de estação (CS) foi o único que não foi significativo ($P<0.05$) para todas as combinações modelo-característica, especificamente para N_{AT} (NGB e LOG) e para N_{GI} (LOG).

5.3.2 Componentes de variância, herdabilidade e repetibilidade

Os componentes de variância estimados para cada modelo variaram em escala (Tabela 4.2). Modelos lineares com (LOG) e sem (LIN) transformação da variável resposta tiveram seus componentes de variância apresentados na escala da variável resposta, enquanto modelos de Poisson (POI) e binomial negativo (NGB) tiveram seus componentes de variância reportados na escala do preditor linear ($\log[\lambda]$). Portanto, a comparação dos modelos pelos componentes de variância estimados é não somente imprecisa, mas incorreta. A inferência foi, então, fundamentada nas estimativas de herdabilidade, de forma a acessar as porções genética e ambiental do total da variância capturada por cada modelo para cada combinação modelo-característica.

A herdabilidade estimada para as características estudadas variou de 0,1650 a 0,2217 para N_{OV} ; 0,1097 a 0,1242 para N_{GI} ; 0,0365 a 0,0662 para N_{AT} ; 0,1146 a 0,1603 para N_{DG} ; 0,1305 a 0,1735 para N_{CLV} e 0,1033 a 0,1666 para N_{EMB} ; dependendo do modelo considerado. Os efeitos genéticos variaram muito mais quando consideradas as características relacionadas à produção de oócitos (N_{OV} , N_{GI} , N_{AT} e N_{DG}) do que às relacionadas a produção de embriões (N_{CLV} e N_{EMB}). A herdabilidade estimada para N_{AT} foram marcadamente baixas (entre 0,0365 e 0,0662).

A capacidade de capturar diferentes fontes de variação (representada pelos efeitos aleatórios incluídos) também variou entre os modelos propostos e entre as combinações modelo-característica. Modelos lineares (LIN) apresentaram os menores valores estimados de herdabilidade para quase todas as variáveis, exceto N_{AT} e N_{GI} . Modelos lineares mediante transformação da variável resposta (LOG) e de Poisson (POI) capturaram proporções médias de variância genética, também exceto para N_{AT} . Modelos binomiais negativos (NGB) capturaram as maiores proporções para o efeito genético aditivo, apresentando os maiores valores de herdabilidade para todas as variáveis estudadas. N_{AT} e N_{GI} , variáveis que exibiram as maiores frequências de zeros no banco de dados, apresentaram as menores estimativas de herdabilidade. Especialmente para estas duas características, o modelo LOG apresentou capacidade prejudicada de detectar o efeito genético aditivo.

A repetibilidade estimada apresentou ampla variação entre os modelos testados. Modelos de Poisson (POI) detectaram maior proporção do efeito de ambiente permanente, porém, tiveram problemas para atingir convergência para N_{AT} , causando o forçamento dos parâmetros para os limites, provavelmente, neste caso, em direção ao valor zero (0).

Tabela 4.2 Estimativas de variância genética aditiva (σ_a^2), variância de ambiente permanente (σ_{pe}^2), variância ambiental (σ_e^2), variância do efeito do reprodutor (cujo sêmen foi usado na IVEP) (σ_b^2), herdabilidade (h^2) e repetibilidade (r) para as características e modelos considerados.

Item		σ_a^2	σ_{pe}^2	σ_b^2	σ_e^2	h^2	r
N _{OV}	LIN	26,0269	58,3901	-	73,2813	0,1650	0,53
	LOG	0,0182	0,0299	-	0,0445	0,1969	0,64
	POIS	0,1296	0,2820	-	0,1819 ^a	0,2184	0,69
	NGB	0,1178	0,1794	-	0,2342	0,2217	0,56
N _{GI}	LIN	1,4201	2,5796	-	8,9402	0,1097	0,31
	LOG	0,0079	0,0143	-	0,0827	0,0757	0,21
	POIS	0,1112	0,2686	-	0,6338 ^a	0,1097	0,37
	NGB	0,0943	0,1237	-	0,5415	0,1242	0,29
N _{AT}	LIN	0,5704	1,8158	-	8,1258	0,0543	0,22
	LOG	0,0036	0,0160	-	0,0807	0,0365	0,19
	POIS	- ^b	- ^b	-	- ^b	- ^b	- ^b
	NGB	0,0795	0,2460	-	0,8747	0,0662	0,27
N _{DG}	LIN	3,0617	4,599	-	19,0515	0,1146	0,29
	LOG	0,0146	0,0160	-	0,0763	0,1367	0,27
	POIS	0,1487	0,2682	-	0,4437 ^a	0,1727	0,48
	NGB	0,1165	0,1154	-	0,4950	0,1603	0,36
N _{CL}	LIN	12,1727	27,2451	1,070	52,7975	0,1305	0,42
	LOG	0,0132	0,0263	0,0018	0,0501	0,1442	0,43
	POIS	0,0946	0,2679	0,0455	0,2056	0,1542	0,59
	NGB	0,0906	0,1588	0,0072	0,2657	0,1735	0,48
N _{EMB}	LIN	3,2498	7,3507	1,3290	19,5344	0,1033	0,34
	LOG	0,0120	0,0207	0,0034	0,05930	0,1257	0,34
	POIS	0,1203	0,2492	0,0634	0,2981 ^a	0,1645	0,50
	NGB	0,1043	0,1545	0,0286	0,3385	0,1666	0,41

LIN: modelo linear (assumindo distribuição Gaussiana); LOG: modelo linear (mediante transformação da variável); POI: modelo de Poisson; NGB: modelo binomial negativo.

^a A aproximação de σ_e^2 foi definida como $\phi\lambda^{-1}$ para os modelos POI.

^b Parâmetros não puderam ser estimados não puderam ser estimados devido à problemas de convergência.

5.3.3 Comparação de modelos e capacidade preditiva

Os parâmetros de dispersão estimados (ϕ) para os modelos POI e NGB são apresentados na Tabela 4.3. O valor de ϕ para POI variou de 1,81 (N_{EMB}) a 2,81 (N_{OV}); e entre 0,21 (N_{OV}) a 0,90 (N_{AT}) para NGB. Os modelos NGB apresentaram, portanto, menor valor de ϕ do que modelos POI para todas as combinações modelo-característica estudados.

Tabela 4.3 Parâmetros de dispersão (ϕ) estimados para os modelos POI e NGB.

Item	N_{OV}	N_{GI}	N_{AT}	N_{DG}	N_{CLV}	N_{EMB}
POI	2,81	1,93	-	2,19	2,50	1,81
NGB	0,21	0,69	0,90	0,55	0,25	0,33

ϕ = Deviance / graus de liberdade

No geral, os modelos POI apresentaram pronunciada superioridade quando comparados aos modelos LIN, LOG e NGB quanto à adequação aos dados de produção *in vitro* de embriões. Os valores observados de MSE e MSEP muito menores para POI. No entanto, modelos POI não puderam atingir resultados acurados para N_{AT} devido à problemas de convergência. Modelos LIN e NGB apresentaram resultados similares de adequação às variáveis estudadas, com valor ligeiramente menor de MSE para LIN, exceto N_{EMB} , para o qual NGB apresentou o menor valor de MSE (16.48 contra 16.79). Modelos LOG apresentaram os maiores valores de MSE para todas as variáveis. No entanto, diferenças mais próximas de MSE foram observadas para N_{AT} e N_{GI} entre os modelos LOG e os outros. Os valores de MSEP estiveram de acordo com os de MSE em todas as combinações modelo-característica.

A Tabela 4.4 apresenta os valores obtidos do erro quadrático médio (MSE) e do erro quadrático médio de predição (MSEP) para as combinações modelo-características estudadas no presente estudo.

Tabela 4.4 Valores do erro quadrático médio (MSE) e do erro quadrático médio de predição (MSEP) entre valores observados e preditos para todas as combinações modelo-característica estudados.

Item		LIN	LOG ^a	POIS	NGB
N _{OV}	MSE	61,43	69,56	52,97	61,86
	MSEP	81,21	98,88	58,23	83,26
N _{GI}	MSE	7,84	9,76	6,60	8,25
	MSEP	10,73	14,18	7,34	11,58
N _{AT}	MSE	7,26	8,81	-	7,32
	MSEP	11,48	15,12	-	12,25
N _{DG}	MSE	16,81	19,53	13,73	16,82
	MSEP	23,12	28,36	15,14	23,17
N _{CLV}	MSE	44,90	50,39	36,75	44,47
	MSEP	60,75	73,18	43,13	60,86
N _{EMB}	MSE	16,79	19,16	13,70	16,48
	MSEP	22,51	27,98	14,01	22,46

^a Valores preditos foram transformados de volta a escala original.

LIN: modelo linear (assumindo distribuição Gaussiana); LOG: modelo linear (mediante transformação da variável); POI: modelo de Poisson; NGB: modelo binomial negativo.

5.3.4 Correlação entre valores genéticos estimados

Ao considerar todos os valores genéticos estimados, o coeficiente de correlação de Spearman apresentou baixa variação entre os modelos. Os valores observados variaram de 0,87 a 0,99 (Tabela 4.5). A maior variação foi reportada para N_{AT} (de 0,87 a 0,95). No geral, o percentual de animais repetidos entre os 10% maiores valores genéticos estimados entre dois modelos apresentou valores inferiores aos coeficientes de correlação de Spearman. N_{GI} apresentou os menores valores (entre 0,61 e 0,74), enquanto N_{EMB} teve os maiores valores (entre 0,69 e 0,80).

Considerando as similaridades entre os 10% maiores valores genéticos estimados, comparações entre os modelos LIN e NGB tiveram os menores números de animais repetidos. De fato, os modelos LIN resultaram nos rankings (top 10% EBVs) menos correlacionados. Para todas as combinações modelo-característica, os modelos NGB e LOG parecem resultar em rankings bastante

similares para os 10% maiores EBVs, variando entre 74% a 82% de animais repetidos.

Tabela 4.5 Coeficientes de correlação de Spearman (ranking) entre os valores genéticos estimados para os animais avaliados (acima da diagonal) e percentual de indivíduos selecionados em comum considerando os 10% maiores valores genéticos estimados (abaixo da diagonal) pelos modelos propostos.

Item		LIN	LOG	POIS	NGB
N _{OV}	LIN	-	0,93	0,92	0,93
	LOG	64%	-	0,95	0,99
	POIS	70%	72%	-	0,95
	NGB	69%	80%	72%	-
N _{GI}	LIN	-	0,92	0,95	0,92
	LOG	63%	-	0,94	0,97
	POIS	68%	65%	-	0,95
	NGB	61%	74%	67%	-
N _{AT}	LIN	-	0,89	-	0,87
	LOG	75%	-	-	0,95
	POIS	-	-	-	-
	NGB	70%	77%	-	-
N _{DG}	LIN	-	0,93	0,93	0,94
	LOG	70%	-	0,96	0,98
	POIS	65%	71%	-	0,96
	NGB	70%	81%	75%	-
N _{CL}	LIN	-	0,93	0,92	0,94
	LOG	69%	-	0,95	0,99
	POIS	68%	73%	-	0,95
	NGB	71%	82%	74%	-
N _{EMB}	LIN	-	0,95	0,95	0,95
	LOG	69%	-	0,96	0,99
	POIS	71%	73%	-	0,97
	NGB	73%	80%	74%	-

LIN: modelo linear (assumindo distribuição Gaussiana); LOG: modelo linear (mediante transformação da variável); POI: modelo de Poisson; NGB: modelo binomial negativo.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Componentes de variância estimados

Estimações de herdabilidades para características relacionadas à produção *in vitro* de embriões são raras na literatura. Merton et al. (2009) reportaram herdabilidade de 0,25; 0,19 e 0,16 para o número de complexos cumulus-oócito, número de embriões clivados e número de embriões viáveis produzidos, respectivamente, para doadoras da raça Holandesa por meio de modelo touro. Nov deve ser considerada bastante similar ao “número de complexos cumulus-oócito”. No entanto, a amplitude das herdabilidades estimadas no presente estudo para Nov foram menores do que reportadas por Merton et al. (2009). Uma razão plausível para tal diferença observada entre características bastante similares é que Nov não incluiu o número de oócitos de grau IV como sendo viáveis. No entanto, esta diferença também pode estar associada a especificidades da frequência dos alelos encontrados nas raças Guzerá e Holandesa.

Estudos considerando a variação genética na produção *in vivo* de embriões podem oferecer uma oportunidade de inferência indireta sobre aspectos genéticos presentes na produção *in vitro*. König et al. (2007) estimaram valor de herdabilidade de 0,096 para o número de embriões transferíveis produzidos após superovulação de doadoras da raça Holandesa. Esta característica pode ser interpretada como similar à N_{EMB} na medida que se refere a capacidade do oócito de produzir estruturas fertilizadas mediante inseminação artificial. Peixoto et al. (2004) trabalharam com doadoras da raça Nelore superovuladas e estimaram herdabilidade de 0,20; também para o número de embriões transferíveis coletados. No presente estudo, estimativas de herdabilidade para o número de embriões produzidos à IVF variaram de 0,1033 (LIN) a 0,1666 (NGB). Analisando os resultados reportados no presente estudo e comparando-os à literatura, parece haver um componente genético capaz de tornar ambas a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões responsivas à seleção.

Este estudo reporta como os efeitos de ambiente permanente na produção *in vitro* de embriões pode variar sob diferentes estratégias de

modelagem. Assim como observado para a variância genética aditiva, ao comparar modelos LMM e GLMM, a inferência deve ser fundamentada sobre razões de componentes de variância. O alto valor de repetibilidade observado para N_{OV} (entre 0.53 a 0.69) mostra que não são necessários muitos registros para uma mesma doadora de forma a acessar seu desempenho à OPU.

A magnitude da repetibilidade estimada para os modelos LIN, LOG e NGB foi similar, porém foram consideravelmente inferiores à estimada em modelos POI. Peñagaricano et al. (2010) realizaram uma análise genética do número de manchas negras em ovelhas da raça Corriedale e observaram que modelos Poisson foram capazes de capturar maior variação oriunda do efeito de ambiente permanente quando comparados ao modelo linear. Estimativas de repetibilidade por parte dos autores foram 0,35 e 0,75 para o modelo linear e Poisson, respectivamente, em uma mesma característica. O mesmo foi reportado por Abdollahi-Arpanahi et al. (2013) ao modelarem o número de inseminações para concepção em vacas da raça Holandês no Irã; e por Pérez-Cabal et al. (2009) trabalhando com registros de contagem de mastite clínica também na raça Holandesa, porém em rebanhos espanhóis.

Apesar de menor do que as variâncias genética aditiva e de ambiente permanente, a variância do efeito do reprodutor (cujo sêmen foi usado na IVEP) apresentou valores consideráveis para N_{CLV} e N_{EMB} , variando de 1,14% a 8,67%, dependendo do modelo considerado. Modelos POI capturaram maior efeito de IVFbull, representando de 7,41% a 8,67% do total da variação, respectivamente para N_{CLV} e N_{EMB} . Trabalhando com um conjunto de dados menor para a mesma população analisada neste estudo, Perez et al. (*in press*) reportaram 1,1% e 4,8% do total da variação explicada pelo efeito do reprodutor (mediante transformação da variável), valores que se apresentam de acordo com os estimados no presente estudo (1,96% para N_{CLV} e 3,56% para N_{EMB}) para modelos LOG.

5.4.2 Comparação geral dos modelos

O parâmetro de dispersão (ϕ) estimado para POI mostrou que, quando sob essa função de verossimilhança, características de produção de embriões

exibiram relação média-variância superior à um, o que aponta para presença de sobredispersão. Valores consideravelmente menores (de ϕ) quando sob modelos NGB sugerem que este é capaz de absorver a variação “Poisson extra”, como indicado por Tempelman & Gianola, 1999. No entanto, em oposição ao esperado pelo autor deste trabalho, modelos NGB apresentaram maior MSE do que modelos POI mesmo quando aplicados sobre variáveis com explícita indicação de sobredispersão (especialmente para N_{OV} e N_{DG}).

Mesmo assim, modelos POI apresentaram grave deficiência para atingir a convergência quando aplicado sobre N_{AT} . Isso pode ter ocorrido devido a forma como os modelos POI (GLMM) interpretam a variação dentro dos grupos contemporâneos. Sendo a característica que apresentou a maior frequência de zeros (0) no banco de dados, a análise de N_{AT} teve diversos grupos contemporâneos com apenas observações de valor zero. Essa particularidade provocou a ausência de variação de qualquer fonte dentro dos grupos contemporâneos. Isso cria um problema, à medida que as observações de valor zero são informativas e, portanto, não podem ser removidas do banco de dados anteriormente a análise. A inclusão de grupos contemporâneos como efeitos aleatórios em modelos POI poderia auxiliar na prevenção dos problemas de convergência, mas essa estratégia não foi abordada no presente estudo. Outra alternativa seria a aplicação de modelos Poisson para distribuições infladas de zeros. No entanto, programas baseados na metodologia REML apresentam diversas dificuldades realizar esta tarefa. A inferência Bayesiana poderia se adequar de forma superior à abordagem frequentista no uso deste tipo específico de modelo generalizado.

O mesmo comportamento foi parcialmente observado ao aplicar modelos LOG para N_{GI} e N_{AT} (ambas variáveis com distribuição inflada de zeros), onde há, provavelmente, grupos contemporâneos com apenas valores “um” para o fenótipo. Apesar deste aspecto também resultar na detecção de ausência de variação, há uma média não-zero dentro do grupo (no caso, $\bar{Y}_i = 1$), evitando problemas de convergência. Dessa forma, herdabilidades estimadas para N_{GI} e N_{AT} sob modelos LOG foram consistentemente menores dos valores obtidos através dos modelos LIN, POI (apenas N_{GI}) ou NGB.

5.4.3 Qualidade do ajuste e capacidade preditiva em validação cruzada

Os menores valores observados de MSE para todas as características estudadas quando utilizado o modelo POI indicam que este se adequou aos dados de forma superior aos modelos LIN, LOG e NGB. Alguns autores reportaram comportamento similar (NAYA et al., 2008; PEÑAGARICANO et al., 2010; VAZQUEZ et al., 2012; AYRES et al., 2013), enquanto outros indicaram qualidade de adequação inferior para modelo de Poisson quando comparado ao modelo linear (VAZQUEZ et al., 2009; ABDOLLAHI-ARPANAHI et al., 2013; VENTURA et al., 2015). Esta falta de concordância de resultados pode ocorrer devido a singularidades das distribuições estudadas. Características cuja distribuição apresenta maior variação nas extremidades parece ser mais bem explicadas por modelos de Poisson, enquanto variáveis que não exibem variação consistente nas extremidades apontam para uma adequação ligeiramente superior (apesar de muitas vezes similar) do modelo linear. Era esperado que Modelos NGB superariam modelos POI ao menos para as variáveis que apresentaram forte indicação de sobredispersão (N_{OV} e N_{DG}), por meio do valor estimado de ϕ . No entanto, a qualidade da adequação dos modelos NGB foi bastante similar aos modelos LIN. Modelos LOG apresentaram os maiores valores de MSE e, dessa forma, a menor capacidade de adequação para as características relacionadas à produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá. Esta abordagem não é, portanto, indicada para explicar variáveis próximas à Poisson. Comportamento similar foi reportado por Ayres et al. (2013). A capacidade preditiva mediante validação cruzada indica o quão preciso é o desempenho de um modelo na predição de fenótipos futuros e, mesmo que este não seja o foco em estudos de melhoramento animal, é uma ferramenta útil para comparação de modelos. No geral, modelos POI superaram todos os outros (LIN, LOG e NGB) para as características estudadas por meio de validação cruzada. Como observado para os valores de MSE, modelos LOG apresentaram a pior capacidade preditiva quando comparado com outros modelos propostos. Os resultados indicam a robustez dos modelos POI sob o método de máxima verossimilhança restrita e as limitações claras da transformação direta da variável para análise genética da produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá.

5.4.4 Correlação e similaridades entre rankings de valor genético estimados

Uma vez que as decisões no melhoramento genético são tomadas sobre o mérito genético dos animais, a associação entre o valor genético estimado por diferentes modelos responde às mais importantes questões sob a perspectiva tanto do criador, quanto dos programas de melhoramento.

O coeficiente de correlação de Spearman entre os modelos implementados apresentou pequena variação e, conseqüentemente que, independente do modelo adotado, houve grande similaridade entre os rankings dos valores genéticos estimados para os animais (Tabela 4.5). Vazquez et al. (2009) reportaram correlações de 0,894 a 0,936 para o efeito genético (sob modelo touro) estimado por modelos linear e Poisson. Peñagaricano et al. (2011) também observaram valores inferiores de coeficientes de correlação de Spearman (0,83) quando comparando modelos linear e Poisson do que os apresentados no presente estudo (de 0,92 a 0,95).

O percentual de animais repetidos entre os 10% maiores valores genéticos estimados na população (por diferentes modelos) apresentaram similaridades de média magnitude (variando de 61% a 82%). Este resultado indica que a análise de associação entre os EBVs para os animais de mérito genético elevado precisa ser realizada, pois estes não seguem necessariamente os valores obtidos pela correlação de Spearman entre todos os EBVs estimados para a população. Dessa forma, reitera-se a superioridade de modelos Poisson em detrimento de modelos lineares gerais para análise genética da produção in vitro de embriões na raça Guzerá sob o método de máxima verossimilhança restrita (REML).

5.5 CONCLUSÃO

Características relacionadas a produção *in vitro* de embriões apresentaram herdabilidades de baixa a média magnitude. Estimativas de repetibilidade variaram bastante entre diferentes modelos e apresentaram, no geral, valores médios a relativamente altos. Modelos Poisson (POI) capturaram maior variância de origem genética aditiva e de ambiente permanente entre todos os modelos propostos. Além disso, modelos POI apresentaram adequação aos dados superior quando comparados aos modelos LIN, LOG e NGB. Modelos NGB não foram capazes de obter melhor qualidade de adequação do que o modelo de Poisson convencional, mesmo quando explicando variáveis superdispersas. A correlação obtida entre os valores genéticos estimados foi alta independente do modelo utilizado. Os resultados obtidos para o número de animais repetidos entre os 10% maiores valores genéticos estimados por diferentes modelos sugerem a importância desse tipo de análise, uma vez que estes valores apresentaram notável variação em relação à análise de associação entre todos os valores genéticos estimados na população por meio de correlação de Spearman. A transformação (logarítmica) da variável resposta (discreta) não é uma abordagem indicada para a modelagem da produção *in vitro* de embriões na raça Guzerá.

5.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDOLAH-ARPANAHI, R.; PEÑAGARICANO, F.; ALILOO, H.; GHIASI, H.; URIOSTE, J.I. Comparison of Poisson, probit and linear models for genetic analysis of number of inseminations to conception and success at first insemination in Iranian Holstein cows. **Livestock Science** 153 (2013) 20–26, 2013.

AYRES, D.R.; PEREIRA, R.J.; BOLIGON, A.A.; SILVA, F.F.; SCHENKEL, F.S.; ROSO, V.M. and ALBUQUERQUE, L.G. Linear and Poisson models for genetic evaluation of tick resistance in cross-bred Hereford x Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 130: 417–424, 2013.

BARUSELLI, P.S.; VIEIRA, L.M.; BATISTA, E.O.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; MARTINS, C.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Updates on embryo production strategies. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.375-382, 2015.

BOLS, P.E.J.; GOOVAERTS, I.G.F.; JORSSEN, E.P.A.; PETRO, E.M.L.; LANGBEEN, A.; LEROY, J.L.M.R. New applications for bovine IVP technology: from 'single oocyte culture' to toxicity screening. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.388-394, 2012.

FOULLEY, J. L.; GIANOLA, D.; IM. S. Genetic evaluation of traits distributed as Poisson-binomial with reference to reproductive characters. **Theoretical and Applied Genetics**, 73: 870- 877, 1978.

GIANOLA, D. and ROSA, G.J.M. One Hundred Years of Statistical Developments in Animal Breeding. **Annual Review of Animal Biosciences**, 3:19-56, 2015.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.L.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J. and THOMPSON, R. ASReml user Guide Release 4.0 VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK. www.vsnl.co.uk, 2014.

KADARMIDEEN, H.N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y.F.; STRØBECH, L.; et al. Genomic selection of *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**, 12: 389-396, 2015.

KÖNIG, S.; BOSSELMANN, F.; VON BORSTEL, U. and SIMIANER, H. Genetic analyses of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90: 3945-3954, 2007.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and cultivation of bovine follicular oocytes. Doctoral thesis, National University of Ireland, 1992.

MATOS, C.A.P.; THOMAS, D.L.; GIANOLA, D.; PEREZ-ENCISO M.; YOUNG, L.D. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: II. Goodness of fit and predictive ability. **Journal of Animal Science**, 75, 88-94, 1997.

MC CULLAGH, P. and NELDER, J. A.: Generalized linear models. Chapman and Hall London – New York, 261, 1983.

MEUWISSEN, T.H.E. and LUO, Z. Computing inbreeding coefficients in large populations. **Genetics Selection Evolution**, 24, 305-313, 1992.

MERTON, J.S.; ASK, B.; ONKUNDI, D.C.; MULLAART, E.; et al. 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.

NAYA H.; URIOSTE, J.I.; CHANG, Y.; RODRIGUES-MOTTA, M.; KREMER, R.; GIANOLA, D. A comparison between Poisson and zero-inflated Poisson regression models with application number of Black spots in Corriedale sheep. **Genetic Selection Evolution**, 40, 379-394, 2008.

PEIXOTO, M.G.; PEREIRA, C.S.; BERGMANN, J.A.; PENNA, V.M.; FONSECA, C.G. Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. **Theriogenology**. 62(8):1459-64, 2004.

PEÑAGARICANO, F.; URIOSTE, J.I.; NAYA, H.; DE LOS CAMPOS, G.; Gianola, D. Assessment of Poisson, Probit and linear models for genetic analysis of presence and number of Black spots in Corriedale sheep. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 128, 105-113, 2010.

PEREZ, B.C; PEIXOTO, M.G.C.D.; BRUNELI, F.T.; RAMOS, P.V.B.; BALIEIRO, J.C.C. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, *in press*.

PÉREZ-CABAL, M.A.; DE LOS CAMPOS, G.; VAZUEZ, A. I.; GIANOLA, D.; ROSA, G.J.M.; WEIGEL, K.A.; ALENDA, R. Genetic evaluation of susceptibility to clinical mastitis in Spanish Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, 92:3472-3480, 2009.

SENEDA, M.M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vitro de ovócitos bovinos. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil, 2001.

RODRIGUES, C.F.M. Historical context of cattle embryo transfer technique in Brazil. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.137-140, 2015.

RODRIGUES-MOTTA, M.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; ROSA, G.J.M. and CHANG, Y. M. A Zero-Inflated Poisson Model for Genetic Analysis of the Number of Mastitis Cases in Norwegian Red Cows. **Journal of Dairy Science**, 90:5306–5315, 2007.

THOMPSON R. Estimation of quantitative genetic parameters. **Proceedings of the Royal Society B**. 275, 679–686, 2008.

TEMPELMAN, T. J.; and GIANOLA, D. A Mixed Effects Model for Overdispersed Count Data in Animal Breeding. **Biometrics**, Vol. 52, No. 1 pp. 265-279, 1996.

TEMPELMAN, T. J.; and GIANOLA, D. Genetic Analysis of Fertility in Dairy Cattle Using Negative Binomial Mixed Models. **Journal of Dairy Science**, 82:1834–1847, 1999.

TONHATI H.; LÔBO, R.B. and OLIVEIRA, H.N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. **Theriogenology** 51: 1151-1156, 1999.

VARONA, L. and SØRENSEN, D. A Genetic Analysis of Mortality in Pigs. **Genetics**, 184:277–284, 2010.

VAZQUEZ, A.I.; GIANOLA, D.; BATES, D.; WEIGEL, K.A.; HERINGSTAD, B. Assessment of Poisson, logit, and linear models for genetic analysis of clinical mastitis in Norwegian Red cows. **Journal of Dairy Science**, Volume 92, Issue 2, Pages 739-748, 2009.

VAZQUEZ, A.I.; PÉREZ-CABAL, M.A.; HERINGSTAD, B.; RODRIGUES-MOTTA, M.; ROSA, G.J.M.; GIANOLA, D.; WEIGEL, K.A. Predictive ability of alternative models for genetic analysis of clinical mastitis. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 129:120–128, 2012.

VENTURA, H.T.; FABYANO, F.S.; VARONA, L.; FIGUEIREDO, E.A.P.; COSTA, E.V.; SILVA, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131500178X> L.P.; VENTURA, R.; LOPES, P.S. Comparing multi-trait Poisson and Gaussian Bayesian models for genetic evaluation of litter traits in pigs. **Livestock Science**. Volume 176, Pages 47-53, 2015. L.P.; VENTURA, R.; LOPES, P.S. Comparing multi-trait Poisson and Gaussian Bayesian models for genetic evaluation of litter traits in pigs. **Livestock Science**. Volume 176, Pages 47-53, 2015.

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**, 9:12-18, 2012.