

RENATO ZANIN

Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

São Paulo

2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2864
FMVZ

Zanin, Renato

Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore. / Renato Zanin. -- 2013.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva.

1. Bovinos. 2. Girolando. 3. Nelore. 4. Brangus. 5. PIVE. 6. OPU. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore”, protocolado sob o nº 3031/2013, utilizando 194 (cento e noventa e quatro) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/5/2013.

We certify that the Research “Efficiency of *in vitro* production of embryos by transvaginal follicle aspiration in Girolando, Brangus and Nelore cattle breeds”, protocol number 3031/2013, utilizing 194 (one hundred, ninety four) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/15/2013.

São Paulo, 20 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZANIN, Renato.

Título: Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICO

**Á minha família,
em especial meus pais Nelson e Ilana e à minha esposa Roberta.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois acredito que sem ele nada é possível.

Agradeço a todos meus familiares, em especial aos meus pais Nelson e Ilana por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado como pilares essenciais para construção de minha vida pessoal e profissional. Ao meu irmão Rafael, sempre companheiro e amigo, um exemplo de pessoa.

Agradeço a minha esposa Roberta pelo apoio, companheirismo, compreensão, dedicação e paciência em seus ensinamentos, sempre estando ao meu lado nas horas boas e ruins me dando força para vencer minhas dificuldades, se tornando uma pessoa essencial para minha vida. Obrigado por estar ao meu lado.

Durante minha formação profissional e acadêmica nesta etapa, tive a honra de conhecer pessoas que fizeram e fazem parte de minha história como Prof. Dr. Otávio M. Ohashi, Prof. Dr. Luiz F. C. Cunha Filho, Samuel Gueyra, Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, Prof. Dr. Paulo R. Adona, Prof. Dr. Paulo Monzani, em especial a empresa Agrop. Laffranchi e ao Prof. Marco A. Laffranchi por terem me dado a oportunidade ingressar e concluir este mestrado, com certeza nunca me esquecerei destas pessoas.

Nada disso seria possível sem a orientação e os ensinamentos do Prof. Dr. Luciano Andrade Silva. Agradeço imensamente por ter aceitado o convite de me orientar, e pelo voto de confiança em mim depositado, realmente me sinto muito honrado em ser seu orientado.

Não posso me esquecer de algumas pessoas, amigos e familiares, os quais sempre me apoiaram e mesmo distantes, estão presentes em minha vida. Minhas avós, tios, primos, cunhadas, sogra e sogro, que sempre estarão acima de todas as conquistas. Por fim devo um especial agradecimento a todos os amigos e amigas que estiveram comigo durante o mestrado, na minha vida particular e no trabalho. Evito citar nomes, pois são inúmeros para poucas páginas. Apesar de alguns estarem distantes no momento, sei que posso contar com todos.

Agradeço a todos os professores e ao programa de pós-graduação de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo conhecimento adquirido durante este período de mestrado.

Muito obrigado!!!

RESUMO

ZANIN, R. **Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore.** [Efficiency of *in vitro* embryos production through transvaginal follicular aspiration in Girolando, Brangus, and Nelore cattle breeds]. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Agropecuária Laffranchi Com. Ind. LTDA, localizada no município de Tamarana – Paraná. O experimento se refere aos resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões através da aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Nelore (CEIP- Certificado Especial de Identificação e Produção), *Bos indicus*, n = 22, Nelore (não CEIP- sem Certificado Especial de identificação e Produção), *Bos indicus*, n = 34, Brangus ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 64) e Girolando ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 52) totalizando 172 animais, no período de 01 janeiro de 2010 a 31 de dezembro de 2012. Todos os animais foram submetidos à OPU (Ovum Pick Up) totalizando 397 procedimentos entre as doadoras, sendo 104 OPUs em Nelore (não CEIP), 52 OPUs em Nelore (CEIP), 133 OPUs em Brangus e 108 OPUs em Girolando. Com estes procedimentos foram aspirados 7335 oócitos, destes 3597 foram considerados viáveis (49%), produzindo 969 embriões (26.93%), destes foram transferidos 922 embriões em receptoras previamente selecionadas, resultando em 266 prenhes (taxa de prenhes 28.85%). Após a obtenção dos oócitos estes eram enviados para o laboratório acima citado para maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, em um período de oito dias. Os embriões produzidos eram transferidos para receptoras de embrião previamente selecionadas e submetidas ao protocolo de TETF (transferência de embrião em tempo fixo), sendo o diagnóstico de gestação realizado aos 30 dias com auxílio de ultrassonografia transretal. Na raça Brangus recuperou-se um total de 2139 oócitos sendo 967 viáveis (45,2%), destes foram obtidos 272 embriões os quais foram transferidos 241 embriões resultando em 81 prenhes (33,3%). Na raça Girolando, foram recuperados 1806 oócitos, destes 972 foram considerados viáveis (53.8%) e resultaram na produção de 251 embriões (25.8%), os quais foram transferidos 245, obtendo-se 61 prenhes (24.9%). Com relação às doadoras da raça Nelore (CEIP), recuperou-se 1850 oócitos, destes 842 foram considerados viáveis (45.5%), resultando em 214 embriões (25.4%), obtendo-se 61 prenhes (28.5%). Na raça Nelore (não CEIP) recuperou-se 1540 oócitos sendo 816 considerados viáveis (53.0%), os quais

resultaram na produção de 232 embriões (28.4%), sendo transferidos 222 dos quais se obteve 63 prenhez (28.4%). De acordo com a análise estatística observou-se que a raça Nelore (CEIP) teve resultados superiores de ($P < 0.0001$) em relação à média total de oócitos por OPU, total de oócitos viáveis por sessão de OPU ($P < 0.0001$), produção de embriões ($P < 0.0001$) e prenhes por OPU ($P < 0,0115$). O presente trabalho forneceu dados inéditos de PIVE (produção *in vitro* de embriões) para discussão nas raças sintéticas Brangus e Girolando (*Bos tauros* x *Bos indicus*), em larga escala, porém, o experimento também destaca a necessidade de mais estudos relacionados à PIVE nessas raças. Quanto ao comparativo entre as raças, observou que a quantidade total de oócitos não variou de acordo com as raças Brangus, Girolando e Nelore (não CEIP), no entanto podemos notar uma grande variação individual de animais da mesma raça, Nelore (CEIP) e Nelore (não CEIP), onde se obteve nas fêmeas da raça Nelore (CEIP, selecionadas) uma maior produção total de oócitos, oócitos viáveis e embriões por sessão de aspiração.

Palavras-chave: Bovinos. Girolando. Nelore. Brangus. PIVE. OPU.

ABSTRACT

ZANIN, R. **Efficiency of *in vitro* embryos production through transvaginal follicular aspiration in Girolando, Brangus , and Nelore cattle breeds.** [Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore]. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

This study was developed at the Laboratory of Animal Reproduction from the “Empresa Agropecuária Laffranchi Com. Ind. LTDA”, town of Tamarana, Paraná State, Brazil. Results from *in vitro* production of cattle embryos through follicular aspiration in the breeds Nelore (CEIP- Special Certificate of Identification and Production), *Bos indicus*, n = 22, Nelore (no CEIP- no Special Certificate of Identification and Production), *Bos indicus*, n = 34, Brangus ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 64) e Girolando ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 52) from January 1st of 2010 to December 31th of 2012 were used totalizing 397 oocyte donors OPU (Ovum Pick Up). From those, 104 OPU were realized in Nelore (no CEIP), 52 OPU in Nelore (CEIP), 133 OPU in Brangus, and 108 OPU in Girolando. The total of recovered oocytes was 7335. Then, the oocytes were sent to the Laboratory for *in vitro* maturation, fertilization and culture during a period of eight days. The number of viable oocytes was 3597 (49%) and 969 embryos were *in vitro* produced (26.9%). A total of 922 were transferred to recipients previously selected and submitted to estrous synchronization using the farm routine FTET (fixed-time embryo transfer) protocol. The pregnancy rate was 28.9% (266 pregnancies). Pregnancy diagnosis was done at the embryo age of 30 days using B-mode transrectal ultrasonography. From Brangus cows, a total of 2139 oocytes were recovered and 967 were classified as viable (45.2%), 272 embryos were produced and 241 were transferred resulting in 81 pregnancies (33.3%). From Girolando cows, 1806 oocytes were recovered and 972 classified as viable (53.8%). A total of 251 embryos (25.8%) were produced, 245 transferred and the pregnancy rate was 24.9% (61 pregnancies). From the Nelore CEIP cows, a total of 1850 oocytes were recovered and 842 were classified as viable (45.5%), 214 embryos were produced and 214 were transferred resulting in 61 pregnancies (28.5%). From Nelore cows, 1540 oocytes were recovered and 816 classified as viable (53.0%). A total of 232 embryos (28.4%) were produced, 222 transferred and the pregnancy rate was 28.4% (63 pregnancies). The Nelore CEIP presented superior results for the number of oocytes recovered per OPU ($P < 0.0001$), for the total of viable oocytes per OPU ($P < 0.0001$), embryos produced ($P < 0.0001$), and total of pregnancies per OPU procedures ($P < 0.0115$). This work presents for the first time data from IVPE from Brangus and

Girolando breeds (*Bos taurox* *Bos indicus*). When the four studied breeds were compared, the results showed a considerable variation between animals in the same breed. Also, it was observed, in the same breed Nelore, a superiority of the Nelore CEIP for oocyte recovery rate, viable oocytes e total of embryos produced by OPU procedure.

Key words: Cow. Girolando. Nelore. Brangus. IVPE. OPU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Média da produção total de oócitos por sessão de OPU nas diversas raças.....	42
Figura 2 -	Comparação de óocitos viáveis x não viáveis por sessão de OPU.....	43
Figura 3 -	Porcentagem de oócitos viáveis e não viáveis entre as diferentes raças.....	44
Figura 4 -	Produção de embriões a partir do número de oócitos por sessão de OPU.....	45
Figura 5 -	Porcentagem de embriões produzidos de acordo com o número total de oócitos viáveis nas diferentes raças analisadas.....	45
Figura 6 -	Média de embriões transferidos por OPU com relação às prenhez.....	46
Figura 7-	Taxa de prenhez comparada entre as diferentes raças.....	47

LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Resultados gerais e individuais por raça nas aspirações das raças Brangus, Girolando, Nelore CEIP e Nelore.....	41
-----------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PECUÁRIA NACIONAL	17
2.2	BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO	18
2.2.1	Inseminação artificial	198
2.2.2	Produção de embriões te/fiv	19
2.2.2.1	Embriões <i>in vivo</i>	19
2.2.2.2	Embriões <i>in vitro</i>	21
2.2.2.3	Vantagens da pive	22
2.2.2.4	Aspiração folicular	23
2.3	OVÁRIO MAMÍFERO	25
2.4	OOGÊNESE	26
2.5	FOLICULOGÊNESE	27
2.5.1	Folículos pré-antrais	27
2.5.2	Folículos antrais	28
2.5.3	Ativação e crescimento do folículos pré-antrais	29
2.6	POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS MAMÍFEROS	30
2.7	ATRESIA FOLICULAR	30
2.8	PIVE NOS DIAS DE HOJE	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	HIPÓTESE	34
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	LOCAL	35
5.2	ANIMAIS	35
5.3	PREPARO DAS DOADORAS	36
5.4	ASPIRAÇÃO FOLICULAR	36
5.5	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	37
5.6	PROTOCOLO DE TRASNFERÊNCIA DE EMBRIÕES	38
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

6	RESULTADOS	40
7	DISCUSSÃO GERAL	48
8	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A pecuária nacional tem se destacado no mercado mundial. O Brasil é o maior exportador de carne bovina e o segundo maior rebanho efetivo de bovinos do mundo. Com este potencial junto ao melhoramento genético, é possível identificar através de programas de melhoramento os melhores reprodutores e matrizes para produção de carne e leite. Com isso se torna necessário a utilização de ferramentas eficientes para a multiplicação destes indivíduos melhoradores. Os estudos das biotecnologias da reprodução entre raças produtoras de carne e leite se tornam cada vez mais necessário para acelerar este melhoramento genético.

O desenvolvimento de novas biotecnologias na reprodução animal tem provocado um aumento significativo na produção animal. Na espécie bovina, se iniciou com a inseminação artificial (IA), a qual se pode geralmente explorar apenas o potencial genético do reprodutor em fêmeas muitas vezes geneticamente inferiores, obtendo-se apenas um bezerro por vaca/ano. Com o surgimento da transferência de embriões (TE) pode-se utilizar touros e vacas superiores zootecnicamente aumentando as possibilidades de se obter uma progênie mais produtiva, podendo uma única doadora aumentar sua produção em até 10 vezes. Com o advento da aspiração folicular (OPU) seguida de fecundação *in vitro* de embriões (FIV) esta produção pode ser ainda maior podendo chegar a até 50 bezerros por vaca/ano, permitindo um melhor aproveitamento dos gametas femininos e a utilização de touros com altos índices zootécnicos e geneticamente superiores. Além disso, a OPU/FIV facilita a utilização de sêmen sexado que tem sido aplicado com bastante sucesso para produção de fêmeas na bovinocultura leiteira e para a produção de machos em animais de corte. Sendo assim, a produção *in vitro* de embriões (PIV) tem sido explorada em escala comercial por várias empresas particulares no intuito de intensificar a produtividade e acelerar o melhoramento genético em rebanhos bovinos.

O Brasil por ser um país tropical, necessita de bovinos que se adaptem às variedades climáticas mantendo uma boa produção de leite e carne. Devido a isso, surgiram raças sintéticas como o Girolando (5/8 Holandês x 3/8 Gir) para produção de leite e a raça Brangus (5/8 Angus x 3/8 Zebu) para produção de carne, e ainda pouco se conhece em termos de resultados de PIV dessas duas raças. Sendo assim, o presente Trabalho comparou a PIVE de duas raças sintéticas dos trópicos (Girolando e Brangus) com a maior raça pura em número de matrizes no Brasil (Nelore). Comparando fêmeas Nelore (não CEIP), com Nelore (CEIP), este

certificado é emitido pelo ministério da agricultura para animais que participam de programas rigorosos de melhoramento genético, onde apenas animais melhoradores em termos de fertilidade e produção conquistam este certificado (CEIP).

O experimento teve como objetivo principal a avaliação da produção total de oócitos, produção total e porcentagem de oócitos viáveis, embriões e prenhes por vaca e procedimento de OPU, e comparara-las quanto a produtividade entre as raças avaliadas.

Os dados resultantes deste trabalho forneceram dados sobre a produção *in vitro* de embriões em raças sintéticas, sendo encontrada maior produção *in vitro* embriões nos animais da raça Nelore, visto que estes animais apresentam um número maior de ondas foliculares por ciclo ovulatório (três ondas foliculares) ocasionando o recrutamento de mais folículos por ciclo. Os animais da raça Girolando e Brangus por se tratarem de animais sintéticos com maior grau de sangue taurino ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*) apresentam um número menor de ondas foliculares por ciclo ovulatório (duas ondas foliculares) ocasionando um menor recrutamento folicular por ciclo estral.

Até a presente data não foram encontrados trabalhos em literatura detalhando a PIVE nas raças Brangus e Nelore (CEIP), portanto este trabalho serve como base de dados na produção *in vitro* de embriões nestas raças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PECUÁRIA NACIONAL

A bovinocultura no Brasil é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no mercado interno e externo. O Brasil ocupa a posição de segundo maior rebanho efetivo do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças de bovinos, e desde 2004 ocupa a primeira colocação nas exportações, totalizando um quinto da carne comercializada no mundo. Segundo o Ministério da agricultura, até 2020, a expectativa da produção de carne no Brasil pode suprir 44,5% do mercado mundial (MAPA, [200-]).

Segundo previsões do MAPA (2012) a estimativa de crescimento da produção leite dos anos de 2012 até 2022 aumentará de 32.539 milhões/litros/ano para 39.250 milhões/litros/ano, enquanto é previsto um aumento de 33.413 milhões/litros em 2012 para 40.208 milhões/litros em 2022, ou seja, a produção em dez anos será menor que o consumo.

Atualmente, os produtores dispõem de diversos programas de melhoramento genético muito bem elaborados que permitem identificar em uma população os animais destaques com maior probabilidade de acerto comparado a uma seleção empírica. E, tal ferramenta, proporciona ganhos genéticos de forma mais acelerada (PARCKERT; GALLO, 2011).

Amer et al. (2001) relata que é importante se ter uma definição dos objetivos econômicos para o desenvolvimento de estratégias do melhoramento genético e identificação de critérios de seleção para se ter um melhor contribuição na predição das características que afetam a lucratividade dos rebanhos comerciais.

Todos os programas de melhoramento genético que são utilizados no Brasil possuem um índice, normalmente baseado em agregados genotípicos os quais podem levar em consideração características de crescimento e sexuais e alguns incorporam características de conformação (LÔBO et al., 2000).

No Brasil, têm-se disponíveis vários programas de melhoramento genético como o Programa de Seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho - Instituto de Zootecnia, Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos - PMGZ - ABCZ, Progenel,

Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore - PMGRN, Programa Qualitas, Sumário Aliança Nelore, Sumário Paint Consolidado, Programa CFM e a Conexão Delta G (PARCKERT; GALLO, 2011).

Todos os animais que são melhorados através de programas de melhoramento genético, indicados pelo programa e avaliados pelos técnicos credenciados, recebem o CEIP (Certificado Especial de Identificação e Produção), o qual garante o desempenho do animal informando os índices das características produtivas avaliadas. O MAPA (Ministério da Agricultura) reconhece o CEIP e dá equivalência ao registro, mantendo seus benefícios. Os melhores animais de cada safra ainda podem ser candidatos ao teste de progênie para comprovação da sua produção (PARCKERT; GALLO, 2011). Com o surgimento de tecnologias na nutrição e reprodução pode-se intensificar a produção animal tanto para produção de carne e leite.

2.2 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO

As biotecnologias se iniciaram com a inseminação artificial (IA), em seguida com a coleta de embriões *in vivo* e por último a produção *in vitro* de embriões.

2.2.1 Inseminação Artificial

A inseminação artificial foi introduzida em 1950 se tornando mais popular na década de 60 e 70. A primeira IA bem sucedida em mamíferos foi obtida em cães da raça Poodle no ano de 1779 por Lazzaro Spallanzani. Em 1951, Stewart obteve o nascimento do primeiro bezerro proveniente de inseminação artificial com sêmen congelado (AX et al., 2004; VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; REICHENBACH et al., 2008).

As vantagens da IA se iniciaram com o surgimento de centrais de touros e sistemas baseados em avaliação genética de bovinos tornando a possibilidade de gerar múltiplos produtos de um touro em um curto espaço de tempo, o que permitiu avaliar estes através de

desempenho de seus produtos. Com isso, os touros geneticamente superiores foram identificados e selecionados e a IA contribuiu mais rapidamente com a disseminação de genes superiores destes animais nos rebanhos nacionais e internacionais. Adicionalmente, a IA é uma ferramenta importante contra a transmissão de doenças venéreas entre animais (AX et al., 2004; VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; REICHENBACH et al., 2008).

2.2.2 Produção de embriões TE/FIV

O número total de bovinos oriundos de embriões *in vitro* e *in vivo* no mundo cresceu consideravelmente, sendo em 2009 de 843.862 para 930.993 em 2010 (STROUD & CALLESEN, 2012).

2.2.2.1 Embriões *in vivo* (TE)

O nascimento do primeiro bezerro de TE foi em 1951 pelos pesquisadores Willett e colaboradores. De acordo com Jainudeen et al. (2004) em 1973 nasceu o primeiro bezerro oriundo de embrião congelado produzido pelos pesquisadores Wilmut e Rowson. Segundo Reichenbach et al. (2008) a TE iniciou comercialmente nos Estado Unidos em 1970 e a primeira tentativa no Brasil foi em 1977.

No início da década de 70, a superovulação e a transferência de embriões (TE) foi desenvolvida envolvendo a administração de hormônios em vacas doadoras para induzir mais que uma ovulação natural, ou seja, múltiplas ovulações. Os oócitos ovulados são fertilizados depois de uma IA convencional e embriões são produzidos e os mesmos migram do oviduto ao útero. No dia 7 após a IA, os embriões estão no corno uterino e podem ser lavados e recuperados do útero (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006). Segundo Jainudeen et al. (2004) esta técnica permite que fêmeas superiores geneticamente sejam superovuladas com hormônios gonadotróficos e seus oócitos são fecundados *in vivo*, os embriões resultantes são transferidos em receptoras de embrião com potencial genético inferior. Inicialmente todos os

embriões até 1970 eram transferidos via técnica cirúrgica para receptoras. Posteriormente, técnicas não cirúrgicas, como a via transcervical, foram desenvolvidas para a coleta e transferência de embriões, sendo a mesma utilizada até os dias de hoje (SENEDA et al., 2002; VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; REICHENBACH et al., 2008).

As vantagens da TE com relação a IA, é a maior intensidade de seleção sobre as fêmeas e aumento da acurácia de seleção (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006). Com a TE pode-se aumentar em até dez vezes o número de produtos de uma vaca por ano, já com a IA se obtém apenas um bezerro por vaca por ano (BASSO et al., 2010). O aumento da taxa de reprodução de fêmeas com alto valor genético, também exerce grande importância para preservação da diversidade genética através da criopreservação de embriões, e possibilita o transporte de embriões congelados entre rebanhos (REICHENBACH et al., 2008).

As restrições do uso da TE segundo Bols et al. (1997) estão nas diferentes respostas aos estímulos gonadotróficos nos diferentes animais e também pela presença de estruturas não fecundadas nas colheitas. Reichenbach et al. (2008) descreveram uma alta variabilidade da terapia hormonal decorrente de fatores ligados ao meio ambiente como nutrição, estabulação e temperatura ambiental, entre outros, e fatores ligados às doadoras como idade, raça, genética, sensibilidade ao estresse, produção de leite e outros fatores ligados à produção e, conservação e aplicação dos hormônios. Estes autores descrevem também que mesmo as doadoras estando em condições ideais, a ausência da resposta ao tratamento superovulatório pode ocorrer em 20% destes animais, e que apenas de 30 a 35% das vacas se consegue obter uma média de seis embriões viáveis por colheita. Bak et al. (1989) observaram a presença de cistos ovarianos, endometrites e lesões iatrogênicas em doadoras submetidas aos procedimentos de colheita de embriões.

Muitos fatores são críticos para o sucesso na transferência de embriões como a experiência do transferidor, técnica, raça e idade das doadoras e receptoras, e tempo e intervalo entre o estro da doadora e a recuperação do embrião, sincronia do estro entre a doadora e receptora, estágio embrionário, mês e estação da transferência (HANEKAMP, 1999; PEIXOTO et al., 2007).

De acordo com Stroud e Callesen (2012), o número de coletas de embriões bovinos sobem menos de 1% de 2009 a 2010. Apesar disso, o número de embriões transferidos subiu mais de 10%, sendo que a transferência de embriões congelados oriundos da superovulação de doadoras corresponde à maior parte desta diferença. Com exceção da África do Sul, é

notável a distribuição uniforme entre todos os continentes referente ao número de embriões transferidos.

A América do Sul apresentou um crescimento modesto de 2009 a 2010 no número de lavados (colheitas de embriões) sendo 11.634 e 12.263 respectivamente, porém, apresentou um aumento expressivo no número de embriões produzidos *in vivo* transferidos em receptoras (de 59.032 em 2009 para 71.558 em 2010), mostrando que a América do Sul transfere mais de 12% dos embriões produzidos *in vivo* do mundo. O Brasil ocupa o primeiro lugar em produção e transferência de embriões *in vivo* da América do Sul (38.975), em segundo está a Argentina (24.263) e seguido pelo Uruguai (3.402) (STROUD; CALLESEN, 2012).

A maioria das superovulações e transferência de embriões no Brasil utilizam os embriões de animais Zebu (*Bos indicus*) e receptoras oriundos do cruzamento de *Bos indicus* x *Bos taurus* devido sua maior disponibilidade e resistência ao estresse ambiental dos trópicos (PEIXOTO et al., 2007).

Globalmente, um número superior de embriões congelados derivados *in vivo* foi transferido de 2009 para 2010 comparado aos embriões frescos (263.036 e 327.525 respectivamente) (STROUD; CALLESEN, 2012).

Com relação ao número de embriões derivados *in vivo* e transferidos no mundo, o Brasil ocupou a terceira posição em 2010 (38.975), atrás apenas do Japão (77.569) e Austrália (59.600) (STROUD; CALLESEN, 2012).

2.2.2.2 Embriões *in vitro* (FIV)

Em 1978, aconteceu o nascimento do primeiro embrião humano de FIV realizado por Louise Brown e a partir daí iniciou-se o desenvolvimento de técnica para uso em bovinos (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; GONÇALVES et al., 2008). Oócitos maduros foram cirurgicamente recuperados de ovários e ovidutos de vacas estimuladas através de hormonioterapia e subsequentemente foram fertilizados cultivados *in vitro* e depois transferidos resultando em 1981, no nascimento de Virgílio, o primeiro bezerro de FIV (BRACKETT et al., 1982).

Pieterse et al. (1988) alteraram a técnica descrita para humanos e descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultrassonografia, que tornou viável o aproveitamento de oócitos bovinos, sem as limitações dos procedimentos existentes até então.

A OPU no início apresentou-se como uma alternativa de recuperação de oócitos para fêmeas com limitações reprodutivas, e posteriormente utilizadas de forma mais ampla e produtiva em fêmeas saudáveis e animais pré púberes, produzindo quatro vezes mais embriões em relação a TE (KRUIP et al., 1994). Após avaliações, a técnica mostrou-se simples e inócua, viabilizando a recuperação, maturação e fecundação de oócitos imaturos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal (BOLS et al., 1991; PIETERSE et al., 1991).

Atualmente, a tecnologia de OPU e PIV consiste em aspirar oócitos de vacas geneticamente superiores pré-selecionadas através da ultrassonografia transvaginal seguida da maturação *in vitro*, fertilização e cultivo destes embriões os quais se desenvolvem nos estágios de mórula ou blastocisto e podem ser transferidos de forma não-cirúrgica para receptoras ou submetidos ao congelamento (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006).

2.2.2.3 Vantagens da PIVE

De acordo com Gonçalves et al. (2008) esta biotecnica proporciona, acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, por meio de aspiração *in vivo* de folículos guiada por ultrassonografia, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impeçam a reprodução de ocorrer de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões. A OPU também apresenta como vantagem o curto intervalo de tempo entre os procedimentos (mínimo de 15 dias, sendo provavelmente o que contribui na preferência da mesma comparado à colheita de embriões nas doadoras da raça Nelore (PONTES et al., 2011). A PIVE pode permitir a obtenção de múltiplos embriões/fêmea/ano com um regime de duas punções semanais por doadora, durante vários meses, superando a eficiência da TE convencional a custos inferiores (GONÇALVES et al., 2002; VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006). É reconhecido que a OPU, e particularmente a FIV, trouxe a base para as tecnologias mais avançadas como

clonagem e transgenia (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; GONÇALVES et al., 2008).

Os oócitos podem ser recuperados de animais jovens (novilhas pré-púberes) e de animais gestantes nos primeiros três meses de gestação (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006; WATANABE et al., 2008). Além disso, vários touros podem ser usados na FIV nos oócitos de uma única aspiração comparado à colheita de embriões que quando se utiliza mais de um touro é necessário o teste de parentesco, maximizando o ganho genético e minimizando a endogamia (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006).

2.2.2.4 Aspiração folicular

Após o desenvolvimento da OPU alguns estudos foram sendo realizados relacionados aos fatores técnicos e biológicos. O método de obtenção dos oócitos possui considerável impacto sobre a quantidade e morfologia dos complexos *cumulus oophorus*, e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento (BOLS et al., 1997). Fatores mecânicos devem ser considerados para otimizar esta técnica como tamanho e tipo da agulha, pressão do vácuo e frequência do transdutor (BECKER et al., 1996; SENEDA et al., 2003). Os resultados disso trouxeram melhora na qualidade dos oócitos recuperados pela redução dos oócitos desnudos (os quais falham em produzir embriões), mas não teve sucesso significativo na melhora no número total de oócitos recuperados por sessão. No entanto, houve uma melhoria na técnica quando se substituiu a agulha de aço inoxidável descartável de 50 cm por uma agulha hipodérmica curta estéril facilmente trocável entre diferentes vacas doadoras, reduzindo o risco de contaminação entre diferentes animais. A vantagem adicional é que as agulhas descartáveis são baratas, não precisam ser limpas, são facilmente manipuladas e tem pequeno diâmetro, o qual minimiza o tempo que o complexo cumulus oócito (CCOs) fica exposto ao ambiente desfavorável (SENEDA et al., 2002; VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006).

Agulhas com calibre menores que 21G e maiores que 17G não devem ser utilizadas, pois impossibilitam a punção do complexo *cumulus oophorus* (CCOs) ou dificultam a aspiração de foliculos de menor diâmetro (HASHIMOTO et al., 1999).

As agulhas de diâmetro maiores de 18G estão relacionadas a maiores taxas de recuperação de oócitos, embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maior dano ao estroma ovariano e maior quantidade de sangue no líquido aspirado. Já as agulhas de diâmetro menor que 19G apresentaram índices reduzidos na recuperação de oócitos, possivelmente por ser mais lenta a sua aspiração do líquido folicular, no momento da punção (SENEDA et al., 2002). Segundo Bols et al. (1996) agulhas de menor calibre estão menos sujeitas a variação na velocidade de fluido aspirado por minuto do que agulhas com calibre interno maior. Agulhas de menor diâmetro resultam na maior recuperação de CCOs de melhor qualidade e menor percentual de oócitos total ou parcialmente desnudos (BOLS et al. 1996.; HASHIMOTO et al., 1999). Agulhas com bisel mais longo demonstraram ter uma maior taxa de recuperação de estruturas e melhor qualidade de oócitos (BOLS et al., 1997).

Experimentos relacionados a pressão do vácuo na OPU realizados por Bols et al. (1996) descreve, que baixas pressões como 50 mmHg, foram pouco eficientes para aspiração, enquanto que pressões acima de 120 mmHg prejudicavam o revestimento do CCOs, o autor também descreve uma grande variação entre trabalhos, com valores de 40 a 400 mmHg. A pressão da bomba de vácuo também pode ser influenciada por outros fatores como, comprimento, diâmetro de conexões, altura da bomba de vácuo e diâmetro da agulha podendo estes também influenciar na pressão final exercida no oócito (SENEDA et al., 2002). Para quantificar a pressão final mais precisamente, Pieterse et al. (1988) sugeriram mensurar o vácuo em volume de fluido por minuto, mesmo assim ocorreram variações de 4,4 a 40 ml por minuto. Gonçalves et al. (2008) descreve que a bomba de vácuo deve estar ajustada para aspirar um volume de 10 ml de líquido por minuto.

Becker et al. (1996) relataram a recuperação de oócitos através de endoscopia e aspiração guiada pela ultrassonografia transvaginal, a qual naquela época vinha ganhando popularidade. E estes pesquisadores avaliaram a eficiência da técnica via ultrassonografia transvaginal e endoscopia quanto a recuperação dos oócitos e encontraram variações na recuperação dos oócitos entre os animais e entre o mesmo animal em diferentes sessões de recuperação, sendo que a taxa de recuperação variou de 0 a 70% via ultrassonografia e 0 a 76% via endoscopia.

A taxa de recuperação de oócitos por sessão guiada pela ultrassonografia transvaginal foi de 44% e através da endoscopia foi de 39% por sessão de aspiração (BECKER et al., 1996). De acordo com Seneda et al. (2003) os transdutores convexos são os mais utilizados na aspiração folicular transvaginal de bovinos. O autor descreve em seu experimento a utilização

de uma alternativa de equipamento na aspiração folicular transvaginal com o uso de um transdutor linear, equipamento este mais utilizado na rotina de médicos veterinários em diagnóstico de gestação de bovinos, do que o transdutor convexo. E em seu experimento obteve resultados semelhantes quanto ao número de oócitos aspirados quando comparou os dois transdutores, sendo 5.4 para o convexo e 4.6 oócitos recuperados para o linear por procedimento de aspiração em animais da raça Blonde d'Quintane. Vários autores relatam o uso de transdutores com diferentes frequências, 7.5 mHz (BOLS et al., 1995), 6.5 MHz (BUNGARTZ et al., 1995) e 5.0 MHz (HASLER et al., 1995).

Os fatores biológicos que foram investigados incluem a própria doadora, pré-estimulação hormonal, frequência e experiência do aspirador e a equipe envolvida no procedimento. Assim como na colheita de embriões, na OPU, a vaca doadora também tem uma influência de 20% nos oócitos aspirados (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006). Por último e não menos importante, a experiência do operador tem um significativo efeito sobre o número e qualidade dos oócitos obtidos e alguns treinamentos em combinações com a seleção dos operadores e ou assistentes podem auxiliar a melhorar os resultados (VAN WAG TENDONK-DE LEEUW, 2006).

2.3 OVÁRIO MAMÍFERO

O ovário mamífero é constituído pelas regiões cortical e medular, ou seja, a primeira contém folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos, a segunda esta localizada na porção mais interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo, algumas células musculares lisas, nervos, artérias e veias (CORMACK, 1991). A camada medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ, 1996). Pequenos vasos sanguíneos estendem-se, a partir da medula, para dentro do córtex ovariano (CORMACK, 1991).

O ovário desempenha funções endócrina e exócrina ou gametogênica. A primeira é responsável pela produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos, e a segunda responsável pela produção e liberação de oócitos (HAFEZ, 1996), a qual é exercida pela interação de dois fenômenos, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991).

2.4 OOGÊNESE

A oogênese em mamíferos é uma sequência de eventos através dos quais as células germinativas primordiais (CGP) desenvolvem-se e diferenciam-se até a formação do oócito haplóide (RÜSSE, 1983). Esta tem seu início na vida fetal, porém apenas alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal quando adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988). Nos ruminantes, a diferenciação e a multiplicação das oogônias, ocorre no desenvolvimento da vida fetal, ou seja, muito antes do parto (BANKS, 1992).

Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP, dentro do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias (GORDON, 1994), iniciando a meiose e diferenciando-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). A transformação de oogônia em oócito é marcada pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno (interfase que segue a última divisão mitótica da oogônia), preparando a célula para a divisão meiótica (GORDON, 1994).

Os oócitos formados começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estágios da prófase I; leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno (HIRSHFIELD, 1991). No estágio de diplóteno, também conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (GORDON, 1994), ocorre a primeira interrupção da meiose e formação dos oócitos primários (MOORE; PERSAUD, 1994). Por vários anos, estes oócitos permanecem nesse estágio até que a maturidade sexual seja alcançada e comecem os ciclos reprodutivos, ou melhor, permanecem no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação, quando então a meiose é retomada (MOORE; PERSAUD, 1994), passando do estado de vesícula germinativa para diacinese (HIRSHFIELD, 1991). Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, exclusão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário (BETTERIDGE et al., 1989). O núcleo do oócito entra na segunda divisão meiótica, avançando apenas até a metáfase II, quando então esta divisão é interrompida (GORDON, 1994). A divisão só será retomada caso ocorra a fertilização com o encontro de um espermatozóide com um oócito, ocorrendo então a exclusão do segundo corpúsculo polar e a formação do oócito haplóide (MOORE; PERSAUD, 1994).

2.5 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é um evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies. Ela caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular, o qual se origina com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório ou de De Graaf (SAUMANDE, 1991; MOORE; PERSAUD, 1994). A oogênese e a foliculogênese ocorrem simultaneamente, quando o oócito está entre as fases de prófase I à metáfase II. A foliculogênese pode ser dividida em duas fases: 1) Fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) Fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários. Ainda na fase pré-natal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e diferenciam-se em folículos primários, secundários e terciários (RÜSSE, 1983). Somente na vida pós-natal, sob efeito hormonal, os folículos podem atingir o estágio pré-ovulatório (FORTUNE, 1994).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1991). De acordo com seu grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários e b) folículos antrais ou cavitários (HULSHOF et al., 1994).

2.5.1 Folículos pré-antrais

Os folículos pré-antrais compreendem cerca de 90% da população folicular do ovário mamífero (ERICKSON, 1986) e constituem o estoque de gametas femininos durante a vida reprodutiva do animal (LIU et al., 2001). Esta classe folicular compreende os folículos primordiais, primários e secundários (HULSHOF et al., 1995), os quais podem ser diferenciados basicamente pelo número e forma das camadas de células da granulosa que circundam o oócito. O crescimento folicular inicia-se com a ativação dos folículos primordiais, sendo caracterizado por mudanças na forma das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, proliferação destas células e aumento de tamanho do oócito (HIRSHFIELD, 1991).

Os folículos primordiais, também denominados de folículos de reserva ou quiescentes, compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário (ERICKSON, 1986) e são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa. O diâmetro médio dos folículos primordiais varia muito de acordo com a espécie animal, sendo 35,2 μm nos bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997).

Os folículos primários são constituídos por um oócito central circundado por uma única camada de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF et al., 1994). Com o seu desenvolvimento, o oócito aumenta de volume, ao mesmo tempo em que surge ao seu redor a zona pelúcida (GEORGE et al., 1998). Na espécie bovina, o diâmetro médio encontra-se em torno de 55,06 μm (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997).

Os folículos secundários são caracterizados histologicamente por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Neste estágio, a zona pelúcida se torna evidente, os mais avançados apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais (VAN DEN HURK et al., 1997). Na espécie bovina, estes folículos possuem um diâmetro médio de 165,5 μm (BRAW-TAL, YOSSEFI, 1997).

2.5.2 Folículos antrais

Folículos antrais são classificados como folículos terciários e folículos de De Graaf, denominados ainda maduros ou pré-ovulatórios. Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, formada pelo acúmulo de líquido durante a evolução do folículo secundário, uma membrana basal e duas camadas de células tecais conhecidas como teca interna e externa (GORDON, 1994). O folículo de De Graaf ou pré-ovulatório, que representa o estágio terminal do desenvolvimento folicular (HULSHOF et al., 1994), apresenta uma grande cavidade preenchida pelo líquido folicular e o oócito aderido à parede do folículo pelas células foliculares. O conjunto de células que envolve o oócito é denominado *corona radiata* (BANKS, 1992; GEORGE et al., 1998). O diâmetro máximo do folículo dominante pode variar em fêmeas *Bos indicus* de 11,3 a 12,1 mm. Já em fêmeas *Bos taurus* com duas ondas

de crescimento folicular são descritos diâmetros de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda respectivamente (GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997).

2.5.3 Ativação e crescimento dos folículos pré-antrais

Para que os folículos primordiais se desenvolvam é necessário que eles sejam ativados. Este processo de ativação se dá pela passagem dos folículos do *pool* de reserva (primordiais) para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório (RUSSE, 1983). O primeiro sinal de ativação é a retomada da proliferação das células da granulosa, ou seja, o folículo primordial, o qual se apresenta circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) transforma-se em folículo primário (VAN DE HURK et al., 1997), circundado por somente uma camada de células cúbicas. Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (HIRSHFIELD, 1991). O conhecimento sobre os fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais é escasso. Entretanto, existem hipóteses de que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de reserva seja predeterminado e, que o FSH (hormônio folículo estimulante) tenha ação sobre essa ativação (BETTERIDGE et al., 1989).

O FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (VAN DEN HURK et al., 1997). Hirshfield (1991) sugeriu que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais devem ser controlados tanto por fatores endócrinos (gonadotrofinas), como por fatores intraovarianos (fatores de crescimento). A ativação continua assim que é iniciada, independentemente da fase do ciclo, idade e gestação (JEWGENOW; PITRA, 1993).

2.6 POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS MAMÍFEROS

Na espécie bovina, a população folicular está em torno de 235.000 folículos por ovário (BETTERIDGE et al., 1989). Nas espécies caprina, ovina e na mulher, este número foi estimado em 37.646 (LUCCI et al., 1999), 160.000 (DRIANCOURT, 1991) e 2.000.000 (ERICKSON, 1986), respectivamente. No entanto, vários fatores, além da variação individual, podem afetar o número de folículos presentes no ovário. Dentre eles, podem ser citados raça (CAHILL et al., 1979), idade (ERICKSON, et.al., 1996; RÜSSE, 1983), níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (ERICKSON, 1986), estado reprodutivo (ERICKSON et al., 1976) e nutricional do animal (SCARAMUZZI et al., 1993).

2.7 ATRESIA FOLICULAR

Há aproximadamente 2×10^6 células germinativas no tecido ovariano de fetos bovinos no final do primeiro trimestre de gestação, mas este número diminui drasticamente durante o período final de gestação até o nascimento quando a ativação folicular tem início. A ovulação e atresia são os dois principais processos envolvidos na diminuição do pool de reserva de folículos pré-antrais do tecido ovariano (SILVA-SANTOS et al., 2011).

Os folículos ovarianos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela constante renovação de folículos antrais no ovário (IRELAND, 1987). No entanto, ao redor de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, mas sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo. Este processo acomete todas as espécies domésticas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (IRELAND, 1987), sendo mais evidente nos folículos antrais, especialmente quando estes atingem um tamanho no qual ocorre a diferenciação terminal das células da granulosa e da teca (LUSSIER et al., 1987; HIRSHFIELD, 1988; SAUMANDE, 1991;). Vários são os fatores que podem influenciar este processo, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação e nutrição (INGRAN 1962).

Independentemente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva

de um animal, fazendo com que o potencial do ovário seja fracamente aproveitado (INGRAN, 1962).

2.8 PIVE NOS DIAS DE HOJE

Mundialmente, o número de embriões produzidos *in vitro* aumentou consideravelmente, subindo em 74.000 (26%). O número de embriões transferidos *in vitro* no mundo mostrou um crescimento de 11% (340.000) em 2010 comparado a 306.000 em 2009 (STROUD, CALLESEN, 2012). A América do Sul foi responsável por 59% (268.000) deste aumento em 2010, comparada a 68% em 2009. O Brasil, país líder mundial na produção de embriões *in vitro*, produziu 264.263 embriões *in vitro*. Destes, foram transferidos 252.048 embriões produzidos *in vitro* a fresco e 12.214 congelados. Ainda em 2010, atrás do Brasil se encontraram países como Panamá (segundo lugar na produção de embriões *in vitro* – 2.905) e o Uruguai (terceiro lugar – 850 embriões *in vitro*). Apenas 7% dos embriões *in vitro* transferidos no mundo eram congelados em 2010 (STROUD; CALLESEN, 2012).

A indústria da PIV tem sido constantemente melhorada nas últimas décadas, ou seja, o número de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* estão similares. O uso da PIV no Brasil tem apresentado grande impacto quando comparada à colheita de embriões e a razão para isso é que os Zebuínos (*Bos indicus*) possuem mais folículos no tecido ovariano e conseqüentemente mais oócitos quando da realização da aspiração folicular comparado com *Bos taurus*. Ainda não está clara a explicação do porquê desta diferença. De qualquer modo, no Brasil, a maioria das informações referentes à FIV estão relacionadas à raça Nelore (*Bos indicus*) o qual representa 80% do rebanho brasileiro (200×10^6 animais) (PONTES et al., 2010).

As fêmeas *Bos indicus* tem mais ondas foliculares, mais folículos por onda e maior população folicular de folículos antrais < 5 mm de diâmetro que as fêmeas *Bos taurus*. Além disso, os folículos dominantes e corpos lúteos são pequenos e o estro é mais curto nos *B. Indicus* comparado às fêmeas *B. taurus* (SILVA-SANTOS et al., 2011).

Silva-Santos et al. (2011) relatam que foi possível recuperar 251 oócitos em uma única sessão de OPU em uma vaca da raça Nelore e há reportações acima de 564 oócitos de uma fêmea da mesma raça. Além da quantidade de oócitos (564) a qualidade destes oócitos

coletado também é impressionante, sendo a maioria classificados como oócitos viáveis (77%, grau I, II e III). A média do número de oócitos aspirados por sessão de OPU em vacas da raça Nelore é reportada entre 18 a 25, ou seja, três a quatro vezes maiores que a média descrita para as vacas *B. taurus*.

A raça Nelore possui aptidão à produção de carne e, além disso, está muito adaptada às condições tropicais do território Brasileiro. Adicionalmente, tem-se observado um grande interesse em raças zebuínas como a Gir considerando a sua adaptabilidade em produzir grandes quantidades de leite mesmo em condições de estresse como pouca disponibilidade de forrageira, parasitismos e altas temperaturas (PONTES et al., 2010).

Estas características são mantidas no cruzamento entre a raça Gir e Holandês, produto denominado “Girolanda”, que está presente na América Central e do Sul. Recentemente, a produção *in vitro* de embriões tem sido considerada em doadoras da raça Girolanda, principalmente quando se fez o uso de sêmen sexado melhorando a eficiência da FIV e da técnica em produzir fêmeas quando o intuito da produção é leite (PONTES et al., 2010).

De acordo com Silva-Santos et al. (2011) o número de oócitos recuperados pela OPU em fêmeas *Bos taurus indicus* é duas a quatro vezes maior do que em fêmeas *Bos taurus taurus*. Porém, quando se comparou a população de folículos pré-antrais destas fêmeas, notou-se que o número destes folículos variou consideravelmente entre indivíduos de mesma categoria e entre as raças, não sendo este o provável fator que interfira na maior taxa de recuperação oocitária nos *Bos indicus*, mas talvez algum mecanismo envolvido no controle do desenvolvimento folicular pós-estágio pré-antral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi comparar a produção *in vitro* de embriões de doadoras das raças Nelore (CEIP e não CEIP), Brangus e Girolando.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados sobre a produção *in vitro* de embriões em raças sintéticas adaptadas ao clima tropical, devido a escassez de dados na literatura .
- Obter a produção total de oócitos, oócitos viáveis, embriões e taxas de prenhes das diferentes doadoras das raças Nelore (CEIP e não CEIP), Brangus e Girolando.
- Comparar os parâmetros coletados entre as diferentes raças e pela média de procedimentos de OPU.

4 HIPÓTESES

A raça Nelore apresenta um número maior de ondas foliculares por ciclo ovulatório (três ondas foliculares), sendo assim, será recrutado um maior número de folículos por ciclo e conseqüentemente será observada uma produção mais expressiva de oócitos e conseqüentemente de embriões, que nas raças sintéticas.

Os animais da raça Girolando e Brangus, por se tratarem de animais sintéticos com maior grau de sangue taurino ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*), apresentam um número menor de ondas foliculares por ciclo ovulatório (duas ondas foliculares) ocasionando um menor recrutamento folicular por ciclo estral e conseqüentemente menor número de oócitos e embriões produzidos *in vitro*, que animais da raça Nelore.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL

O experimento foi realizado no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012 no Laboratório de Reprodução Animal da Agropecuária Laffranchi, localizada na cidade de Tamarana, estado do Paraná, Brasil.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizadas doadoras das raças Nelore (não CEIP, *Bos indicus*, n = 34), Nelore (CEIP, *Bos indicus*, n = 22), Brangus ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 64) e Girolando ($5/8$ *Bos taurus* x $3/8$ *Bos indicus*, n = 52), saudáveis, não gestantes, ciclando, nulíparas e multíparas, previamente selecionadas e de alto valor genético. Estes animais apresentavam escore corporal de $3,5 \pm 0,5$ (escala de 1 - 5) (LOWMAN et al., 1976), com peso médio de 500 ± 50 kg e idade média de $5 \pm 2,3$ anos (3-7 anos). Todas as doadoras foram avaliadas por palpação e ultrassonografia transretal anterior a cada um dos procedimentos de OPU e as mesmas apresentavam atividade ovariana regular.

Os animais permaneceram na mesma propriedade durante a realização do experimento. As doadoras da raça Nelore e Brangus permaneciam em pastagem mista de *Brachiaria Brizantha* e Estrela Africana (*Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis*), com sal mineral e água *ad libitum*. Já as doadoras da raça Girolando permaneciam na mesma pastagem, porém, com suplementação de silagem de milho acrescida de ração comercial com 22% PB (para cada 3 litros de leite produzido, fornecia-se 1 kg de ração), além de sal mineral e água *ad libitum*.

Nenhuma hormonioterapia exógena foi administrada para estimular a produção ou sincronização de onda folicular. Todos os animais foram submetidos à OPU totalizando 397 procedimentos, com uma média de $2,3 \pm 0,7$ (2,1-3,1) OPU por vaca. Alguns animais foram aspirados diversas vezes, outros foram submetidos a apenas um procedimento. As doadoras foram submetidas à OPU sem uma escala específica ou predeterminada, sendo que os procedimentos foram feitos de forma aleatória. As aspirações quando repetidas, foram realizadas com no mínimo 15 dias de intervalo entre elas, em qualquer estágio do ciclo estral. As doadoras da raça Nelore foram submetidas a 104 OPUs, as Nelore CEIP à 52 OPUs, as Brangus à 133 OPUs e as da raça Girolando à 108 OPUs.

5.3 PREPARO DAS DOADORAS

Antes de cada procedimento de OPU, as fezes foram removidas do reto e a área perineal foi limpa com água de torneira e álcool 70%. Em seguida, cada vaca recebeu anestesia epidural com 5 ml de lidocaína a 2% (Anestésico L, Pearson, São Paulo, SP, Brasil) para diminuir o peristaltismo e desconforto.

5.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

O procedimento usado para aspiração folicular foi o mesmo, previamente descrito por Seneda et al. (2001). Brevemente, cada folículo visível foi aspirado usando um ultrassom em tempo real modo B (DP- 2200 vet, Mindray, Shenzhen, China), com um transdutor convexo de 6,5 MHz (65C15EAV Micro-convexo- Mindray, Shenzhen, China), o mesmo foi adaptado para uma guia de aspiração transvaginal específica para o sistema reprodutor bovino. A punção dos oócitos nos folículos ovarianos foi feita com a utilização de uma agulha 18 G

(WTA[®] - São Paulo, Brasil) conectada a um sistema de aspiração (WTA[®] - São Paulo, Brasil) acoplado a um tubo falco cônico de 50 ml (Corning, Acton, MA, USA) de silicone (0,8 m; 2 mm), para a punção dos folículos este sistema transmite uma pressão que é determinada por uma bomba de vácuo digital BV 003i (WTA[®] - São Paulo, Brasil) ajustada para uma pressão de 90 mmHg.

5.5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DOS EMBRIÕES

Imediatamente depois da recuperação, o material aspirado foi lavado e filtrado através de um filtro de embriões (WTA[®] - São Paulo, Brasil) com solução de PBS (phosphate buffer solution - Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Os complexos cúmulo oócitos (CCOs) foram classificados de acordo com a presença de células no cúmulo e a qualidade do oócito usando o critério que segue: bom, mais que três camadas de células no cúmulo; regular, uma única camada de células no cúmulo; desnudo, parcialmente coberto por células do cúmulo ou sem cúmulo e atresico cumulus oócitos escuro com sinais de degeneração do citoplasma (Seneda et al., 2001). Os oócitos bons e regulares foram considerados viáveis e utilizados, e os folículos atresicos foram descartados. Anteriormente à maturação *in vitro* (MIV), o CCOs foram lavados tres vezes em TCM 199 HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com SFB a 5% e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina e, em seguida foram lavados uma vez em bicarbonato TCM 199 (Gibco Life Technologies) suplementado com SFB a 10%, 5 µg hormônio luteinizante (LH-Ayerst, Rouses Point, NY, USA), 0.5 µg de hormônio folículo estimulante (FSH-Folltropin, Vetrepharm, Belleville, ON, Canada), 1 µg estradiol (estradiol-17β, Sigma E-8875), 2.2 µg piruvato (Sigma P-4562) e 50 µg de gentamicina/mL de meio.

O CCOs de cada categoria foi separadamente cultivado por 22 horas em 100 µl de gotas de meio de maturação sob óleo mineral (D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brasil) a 38 °C e 5% de CO₂ em ar (BLASCHI et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006). Foram usados sêmen congelado de touros das raças Girolando (n= 14), Brangus (n= 9), Nelore (n= 9) e Nelore CEIP (n= 5) de fertilidade conhecida (baseado em utilizações prévias na FIV). Para a FIV, as palhetas foram descongeladas por 30 segundos em banho Maria a 37 °C. Os espermatozoides

foram lavados por centrifugação a 800 “g” por 5 minutos através de 90-45% de gradiente de Percoll, após a retirada do sobrenadante foi adicionado 1 ml de meio TALP, e uma nova centrifugação de 2 minutos a 200 “g” foi utilizada para remover o excedente do Percoll. Os espermatozóides foram capacitados usando heparina (20 µg/mL) e a motilidade estimulada com a adição de 40 µL/mL de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PARRISH et al., 1986). Após a avaliação da motilidade, a concentração dos espermatozóides foi ajustada a 2×10^6 espermatozóides móveis /mL e cada gota de fertilização recebeu 4 µL de espermatozóide (concentração final de 1×10^5 espermatozóides/gota) (SENEDA et al., 2001). Após a maturação, o CCOs foram lavados três vezes no meio pré-fertilização TCM 199 suplementado com 25 mM HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 0.3% SFB (Sigma A-9647), e foram lavados uma vez no meio de fertilização TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina e 160 µL solução PHE (PARRISH et al., 1986; BAVISTER et al., 1989).

Os zigotos que tinham seus cópulos foram previamente removidos e transferidos a gotas de 100 µL de meio de cultivo de embriões (SOFaa BSA, containing 8 mg/mL SFB e 1 mM de glutamina). Após a FIV, os oócitos foram desnudados com auxílio de um micropipetador de 50 µl e transferidos para meio de cultivo *in vitro* (CIV) fluido de oviduto sintético (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais (BME) e não essenciais (MEM), 0,34mM de mioinositol, 3% de soro fetal bovino, 4mg/ml de BSA, ITS (insulina 5 µl/ml e glutamina 0,09mg/ml), em gotas de 100 µl de meio com monocamada de células somáticas (*cumulus*). O cultivo *in vitro* foi feito em estufa de CO₂, a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Os embriões permaneceram nestas condições ate o momento da transferência nas receptoras.

A osmolaridade foi mantida de 270 a 280 mOsmol e o pH foi de 7,4. A taxa de embriões foi obtida do total de oócitos viáveis aspirados. Todos os embriões foram transferidos em receptoras de embrião no Dia 7 do embrião.

5.6 PROTOCOLO DE TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES

As receptoras utilizadas para a transferência dos embriões produzidos *in vitro* eram mestiças das raças Pardo Suiço e Nelore, saudáveis sendo novilhas (15-23 meses de idade) e

vacas (24 a 48 meses de idade). O critério para a escolha da receptora foi a presença de ciclos ovarianos regulares, escore corporal apropriado e serem saudáveis. Após a avaliação os animais aptos foram submetidos a protocolo de TETF (transferência de embrião em tempo fixo), que consistiu nos procedimentos seguintes, D0- colocação de implante intravaginal com liberação lenta de progesterona (DIB[®] - Syntex, Argentina) e aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol[®] - Syntex, Argentina), D8- retirada do implante de progesterona com aplicação de 0,5 mg de PGF 2 α (Ciosin[®] - Ouro Fino, Brasil), 400 UI de ECG (Folligon[®] - Intervet, Holanda), 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP[®] - Ouro Fino, Brasil), a transferência de embriões em tempo fixo era realizado no dia 17 do protocolo somente nas receptoras que apresentavam corpo lúteo (CL) ovariano, assim o embriões eram depositados por via transcervical no corno uterino ipsilateral ao CL apresentado no ovário. O diagnóstico gestacional era realizado através de ultrassonografia transretal no dia 30 de gestação.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre proporções foram feitas pelo teste de Qui-quadrado. Dados objetivos foram verificados para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados não normais foram transformados para adquirirem normalidade (ex. escala logarítmica). Após verificação da normalidade, análise de variância foi feita com o uso do programa SAS (GLM procedure; version 9.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC) para determinação dos efeitos principais e de interação. Teste *t*-student foi utilizado para localizar diferenças entre médias dentro do mesmo grupo ou entre grupos quando efeitos principais e/ou de interação foram significativos. Probabilidade de $P \leq 0.05$ indicou significância.

6 RESULTADOS

Das 172 doadoras que foram submetidas a 397 sessões de OPU, foi recuperado 7335 oócitos (18.4 oócitos/OPU), dos quais resultaram em 3597 oócitos viáveis (49%), obtendo-se 969 embriões (26.9%), dos quais 922 foram transferidos em receptoras previamente selecionadas, resultando em 266 prenhez (taxa de prenhes 28.9%). Os resultados descritos também estão ilustrados na tabela 1.

Do total de doadoras 64 fêmeas eram da raça Brangus, as quais foram submetidas a 133 sessões de OPU, recuperando-se 2139 oócitos, produzindo 967 oócitos viáveis (45.2%), os quais resultaram em 272 embriões (28.1%) e 241 foram transferidos, obtendo-se 81 prenhez (33.6%) aos 30 dias de gestação. Na raça Girolando, 52 fêmeas foram submetidas à aspiração folicular, totalizando 108 sessões de OPU, as quais foram recuperados 1806 oócitos. Destes, 972 foram considerados viáveis (53.8%) e resultaram na produção de 251 embriões (25.8%), os quais foram transferidos 245, obtendo-se 61 prenhez (24.9%) aos 30 dias de gestação. Com relação às doadoras da raça Nelore CEIP, 22 fêmeas foram submetidas a 52 sessões de OPU, recuperando-se 1850 oócitos. Destes, 842 foram considerados viáveis (45.5%), resultando em 214 embriões (25.4%), do quais todos foram transferidos, obtendo-se 61 prenhez (28.5%) aos 30 dias de gestação. Na raça Nelore (não CEIP) foram aspiradas 34 fêmeas, as quais foram submetidas a 104 sessões de OPU, recuperando-se 1540 oócitos sendo 816 considerados viáveis (53.0%), os quais resultaram na produção de 232 embriões (28.4%), sendo transferidos 222 dos quais se obteve 63 prenhez (28.4%) aos 30 dias de gestação (Tabela 1).

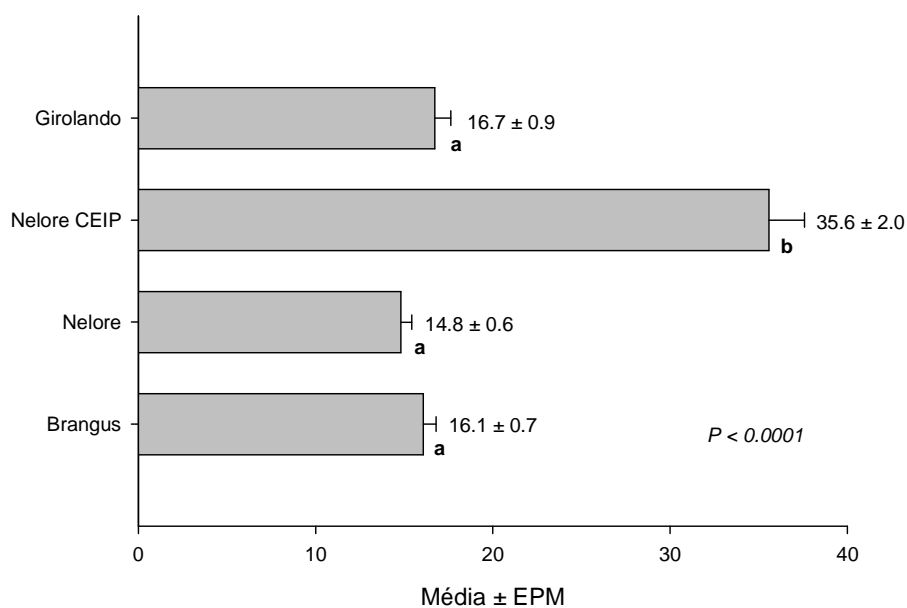
Tabela 1- Resultados gerais e individuais por raça nas aspirações das raças Brangus, Girolando, Nelore (CEIP) e Nelore (não CEIP).

Raça	Brangus	Girolando	Nelore CEIP	Nelore não CEIP	P	Total
Doadoras	64	52	22	34		172
Aspirações realizadas (OPU)	133	108	52	104		397
Oócitos recuperados (total)	2139	1806	1850	1540		7335
Oócitos viáveis (total)	967	972	842	816		3597
% de oócitos viáveis	45.2^a	53.8^b	45.5^a	53.0^b	0,0001	49.0
Embriões produzidos (total)	272	251	214	232		969
% de embriões produzidos / oócitos viáveis	28.1	25.8	25.4	28.4	0,3580	26.9
Embriões transferidos (TE)	241	245	214	222		922
Prenhezes positivas (total)	81	61	61	63		266
Taxa de prenhez	33.6	24.9	28.5	28.4	0,2069	28.9

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças estatísticas significativas.

Em comparação com a média de produção de oócitos por procedimento de aspiração, obteve-se na raça Nelore CEIP uma diferença estatística significativa de ($P < 0.0001$), comparado com as raças Brangus, Nelore (não CEIP) e Girolando, as quais não apresentaram diferenças estatísticas entre elas (Figura 1).

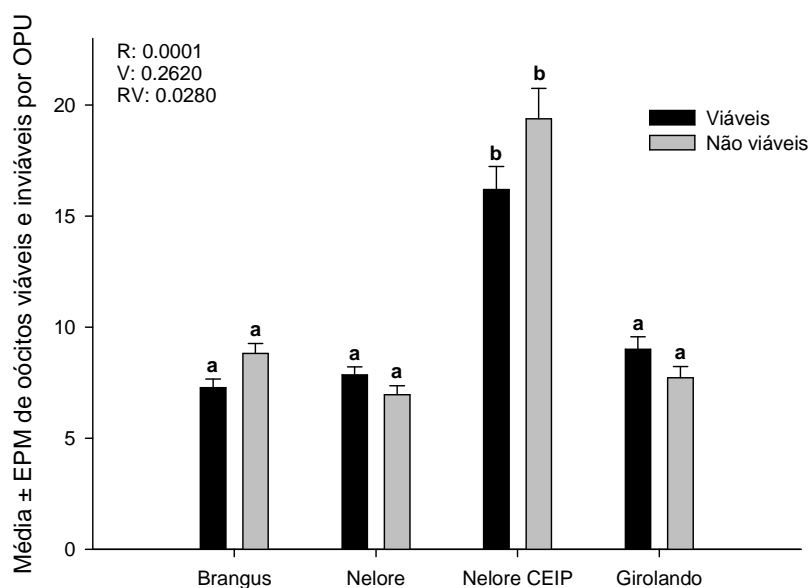
Figura 1- Média da produção total de óocitos por sessão de OPU nas diversas raças.



Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

Em comparação com o número de óocitos viáveis e não viáveis por sessão de OPU por raça, percebeu-se que nos animais da raça Nelore CEIP foram recuperados um maior número de óocitos viáveis e não viáveis, 16.2 e 19.38, respectivamente, o qual apresentou diferença estatística ($P < 0000.1$) quando comparado aos óocitos viáveis e não viáveis nas raças Brangus, Nelore (não CEIP) e Girolando (Figura 2).

Figura 2- Comparação de óocitos viáveis x não viáveis por sessão de OPU.

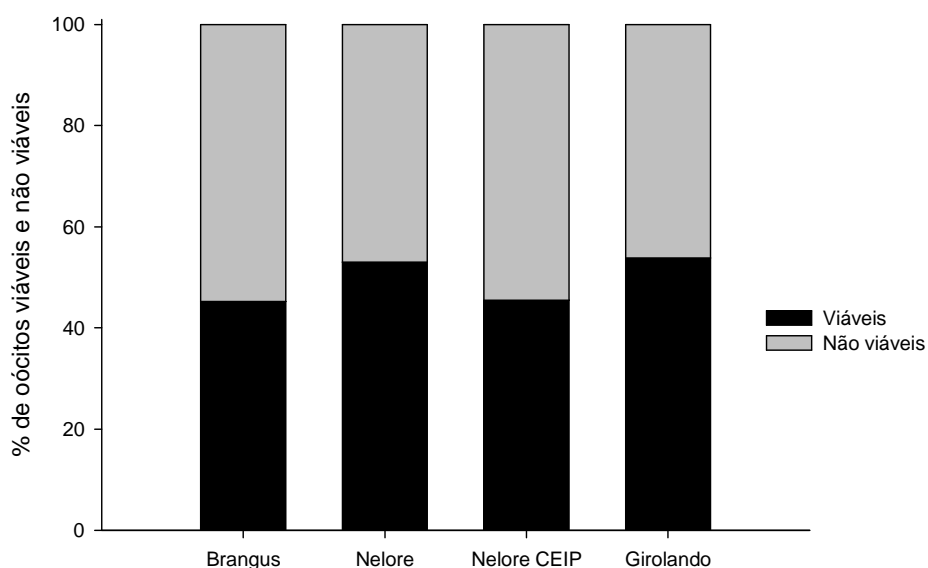


Média ± EPM	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando
Viáveis	7,3 ± 0,4	7,9 ± 0,4	16,2 ± 1,1	9,0 ± 0,6
Não viáveis	8,8 ± 0,5	7,0 ± 0,4	19,38 ± 1,4	7,7 ± 0,5
Total	8,0 ± 0,3	7,4 ± 0,3	17,8 ± 0,8	8,4 ± 0,4

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

Quando se comparou a porcentagem de óocitos viáveis entre todas as raças analisadas. Os resultados encontrados foram iguais estatisticamente para as raças Brangus (45.2%) e Nelore CEIP (45.5%) e o mesmo aconteceram com as raças Nelore (não CEIP) (53.0%) e Girolando (53.8%). Porém, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0.0001$) quando se comparou a porcentagem de óocitos viáveis entre as raças Brangus e Nelore CEIP e as raças Nelore (não CEIP) e Girolando (Figura 3).

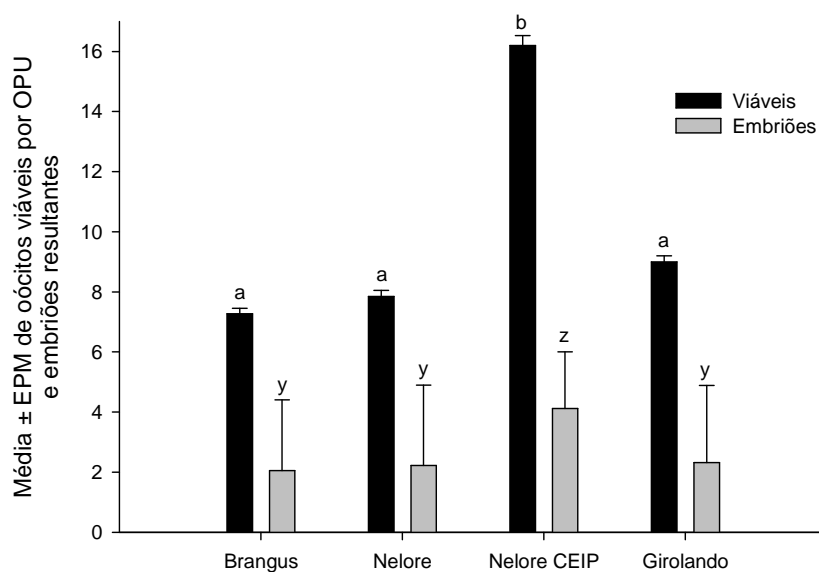
Figura 3- Porcentagem de oócitos viáveis e não viáveis entre as diferentes raças.



Média ± EPM	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando
Viáveis	45,2	53,0	45,5	53,8
Não viáveis	54,8	47,0	54,5	46,2

Com relação à produção de embriões a partir do número de oócitos viáveis recuperados por sessão de OPU, obteve-se na raça Nelore CEIP um número expressivo de oócitos viáveis (16.2) e embriões (4.1) produzidos, diferente estatisticamente ($P < 0.0001$) quando comparado às raças Brangus (2.0 embriões/OPU), Nelore (não CEIP) (2.2 embriões/OPU) e Girolando (2.3 embriões/OPU) (Figura 4). Porém quando se avaliou a taxa de produção de embriões com relação ao número total de oócitos viáveis notou-se que não houve diferença estatística entre as raças (Nelore CEIP: 25.4%, Brangus: 28.1%, Nelore não CEIP: 28.4% e Girolando: 25.8%; $P > 0,05$; Figura 5).

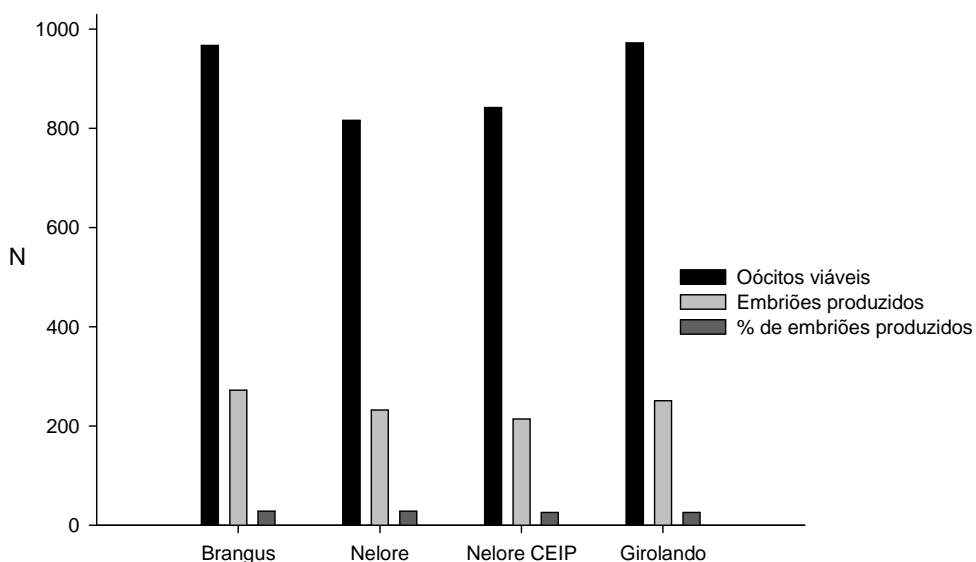
Figura 4- Produção de embriões a partir do número de oócitos por sessão de OPU.



Média ± EPM	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando	<i>P</i>
Oócitos viáveis	7,3 ± 0,4 ^a	7,9 ± 0,4 ^a	16,2 ± 1,1 ^b	9,0 ± 0,6 ^a	0,0001
Embriões	2,0 ± 0,2 ^y	2,2 ± 0,2 ^y	4,1 ± 0,3 ^z	2,3 ± 0,2 ^y	0,0001

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

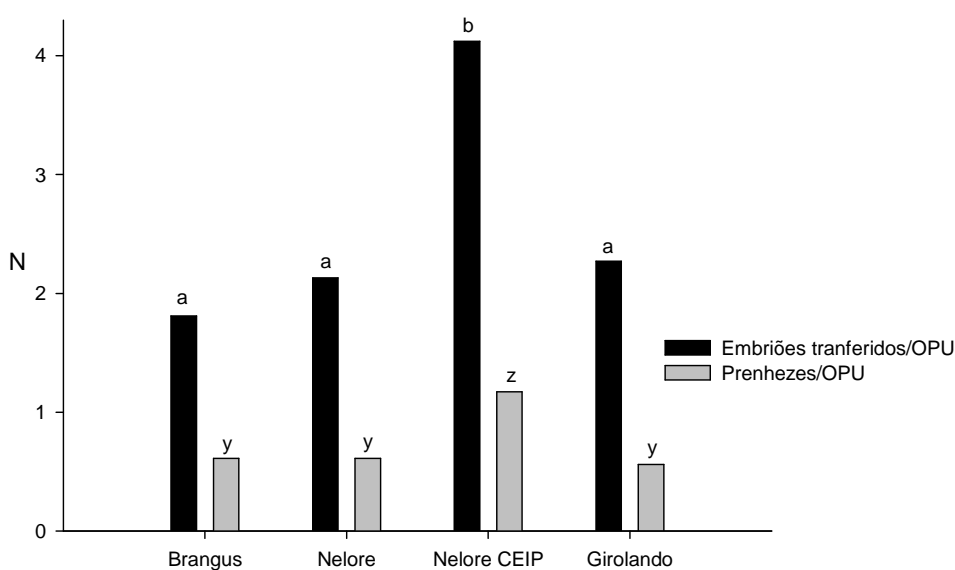
Figura 5- Porcentagem de embriões produzidos de acordo com o número total de oócitos viáveis nas diferentes raças analisadas.



N	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando
Oócitos viáveis (A)	967	816	842	972
Embriões (B)	272	232	214	251
% (A/B; <i>p</i> > 0.05)	28,1	28,4	25,4	25,8

Dos embriões transferidos por sessão de OPU na raça Nelore CEIP (4,1) difere estatisticamente ($P < 0,0002$) tais como as prenhez obtidas (1,2 prenhez) ($P < 0,0115$) com relação às outras raças, ou seja, nas raças Brangus produziu-se 1.8 embriões/OPU, Nelore (não CEIP) 2.3 embriões/OPU e Girolando 2.13 embriões/OPU obtendo-se 0.6 prenhes por sessão de OPU (Figura 6).

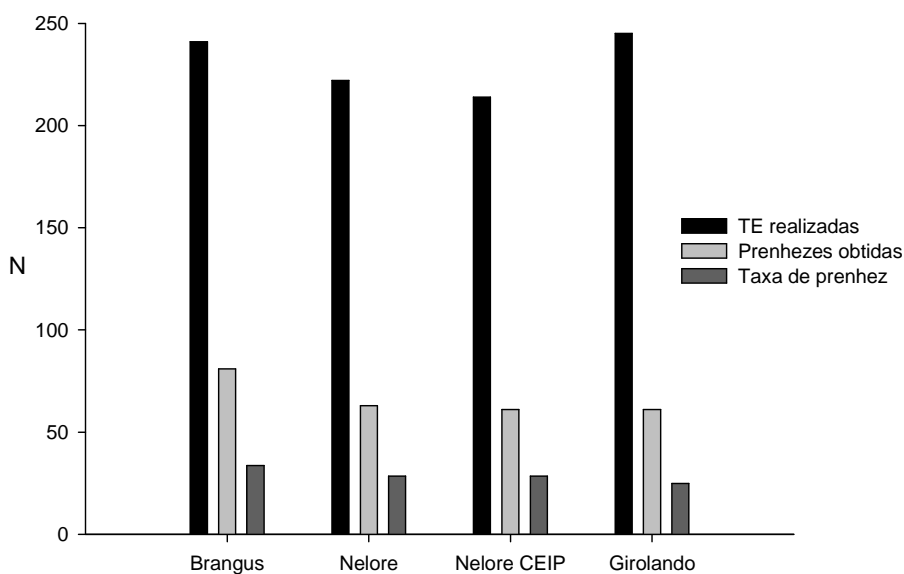
Figura 6- Média de embriões transferidos por OPU com relação às prenhez.



Total	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando	<i>P</i>
OPU (A)	133	108	52	104	
TE (B)	241	245	214	222	
Prenhez (C)	81	61	61	63	
B/A	1,8 ^a	2,3 ^a	4,1 ^b	2,13 ^a	0,0002
C/A	0,6 ^y	0,6 ^y	1,2 ^z	0,6 ^y	0,0115

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

Figura 7- Taxas de prenhez comparada entre as diferentes raças.



N	Brangus	Nelore	Nelore CEIP	Girolando
TE (A)	241	222	214	245
Prenhezes + (B)	81	63	61	61
% (A/B; $p > 0,05$)	33,6	28,4	28,5	24,9

Na figura 7, pode-se observar que o número de embriões transferidos comparados às taxas de prenhezes obtidas aos 30 dias de gestação nas diferentes raças, não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

7 DISCUSSÃO GERAL

Com o presente trabalho se obteve dados ao longo de três anos com número relevante de aspirações e se comparou três raças importantes no território nacional. Tanto os animais como o laboratório de produção dos embriões estavam localizados na mesma propriedade. Todas as sessões de OPU foram realizadas pelo mesmo técnico, podendo-se afirmar que as variações técnicas foram diminutas. Poucos trabalhos foram realizados em larga escala de produção *in vitro* de embriões, podendo-se destacar como exemplo o de Pontes et al. (2009) que comparam resultados de prenhez *in vivo* e *in vitro* em animais da raça Nelore, Pontes et al. (2010) forneceram dados sob a PIVE em larga escala de doadoras *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos indicus x Bos taurus*. E, Pontes et al. (2011) descrevendo a produção em larga escala de embriões *in vitro* de fêmeas da raça Nelore.

Os dados aqui obtidos permitiram comparar a produção *in vitro* de embriões de animais de raças sintéticas (*Bos tauros-indicus*), com animais selecionados em programas de melhoramento genético para fertilidade (Nelore CEIP - *Bos indicus*), como sendo a maior raça pura em número de indivíduos no Brasil (Nelore - *Bos indicus*).

Durante a execução do trabalho foram recuperados 7335 oócitos, utilizando 172 doadoras em 397 sessões de aspiração (18.47 oócitos/OPU), dos quais resultaram em 3597 oócitos viáveis (49%), obtendo-se 969 embriões (26.93%), dos quais 922 foram transferidos em receptoras previamente selecionadas, resultando em 266 prenhez (taxa de prenhez = 28.85%).

Com relação à raça Nelore CEIP, recuperou-se uma média total de 35,6 oócitos por sessão de OPU (52 OPU/1850 oócitos), estes resultados são superiores aos encontrados por Pontes et al. (2009) cuja média total foi de 25,6 oócitos por OPU a de Pontes et al. (2011) com média total de 31,7 oócitos por sessão de OPU. Porém, nos animais da raça Nelore (não CEIP) foi obtido uma média inferior (14,8 oócitos/OPU; 104 OPU/1540 oócitos) aos resultados supracitados. A alta taxa de recuperação total de oócitos na raça Nelore (CEIP-Certificado Especial de Identificação e Produção), se da ao fato de serem animais, oriundos de programas de melhoramento genético. De acordo com Parckert e Gallo (2011) estas avaliações são realizadas através de índices de fertilidade, precocidade sexual e produtividade, onde este certificado só é emitido para animais que comprovem serem melhoradores de suas safras.

Vacas da raça Nelores normalmente têm uma maior quantidade de folículos de menor tamanho que as *Bos tauros*, sendo recuperados de 18 a 25 oócitos por sessão de OPU nos animais da raça Nelore. As fêmeas *Bos indicus* apresentam mais ondas foliculares ovarianas (três ondas) que as fêmeas *Bos tauros* (duas ondas), e também um maior número de folículos > 5 mm por onda. Devido a esta maior eficiência em se recuperar oócitos oriundos de folículos < 4 mm de diâmetro, uma maior quantidade de folículos menores são aspirados, conseqüentemente um maior número de oócitos são recuperados nos animais da raça *Bos indicus* que de doadoras *Bos tauros* (PONTES et al., 2009; PONTES et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2011).

De acordo com Silva-Santos et al. (2011) o número de oócitos recuperados pela OPU em fêmeas *Bos taurus indicus* é duas a quatro vezes maior do que em fêmeas *Bos taurus taurus*. Porém, quando se comparou a população de folículos pré-antrais destas fêmeas, notou-se que o número destes folículos variou consideravelmente entre indivíduos de mesma categoria e entre as raças, não sendo este o provável fator que interfira na maior taxa de recuperação oocitária nos *Bos indicus*, mas talvez algum mecanismo envolvido no controle do desenvolvimento folicular pós-estágio pré-antral.

Silva-Santos et al. (2011) relata que não há diferença entre o número de folículos pré-antrais (primordiais, primários ou secundários) nos ovários de fetos ou novilhas da raça Nelore ou *Bos taurus*, sugerindo que o número total de folículos não seja a razão para tal diferença na produção de oócitos. Pontes et al. (2009) em prévios estudos, demonstrou que a taxa de recuperação por sessão de OPU/PIV na raça Holandês é de 4,1 oócitos na qual representa aproximadamente 16% do número de oócitos obtidos com a OPU nos animais da raça Nelore.

As fêmeas da raça Nelore têm uma grande variabilidade individual em relação ao número de folículos e oócitos, mas mesmo assim, a média de oócitos aspirados por sessão das raças de origem européia (1,9 a 9,9 oócitos/sessão de OPU) não superam as das raças zebuínas (18 a 25 oócitos/sessão de OPU) (PONTES et al., 2010). Devido a isso, têm sido identificados alguns fatores que podem interferir na produção de oócitos como idade (ERICKSON, et.al., 1976;RÜSSE, 1983), raça (CAHILL et al., 1979), níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (ERICKSON, 1986), condição nutricional (SCARAMUZZI et al., 1993), estado reprodutivo (ERICKSON et al., 1976), estresse calórico e número de procedimentos de aspiração (PONTES et al., 2010). Porém Pontes et al. (2011) avaliou em seu experimento, animais com uma ou seis sessões de aspiração, e não houve diferença significativa na média produção de oócitos por doadora. O autor relata também que houve

grande variação em algumas doadoras quanto ao número de oócitos recuperados por OPU, sendo a média constantemente alta em algumas doadoras (>30), baixa em outras (<14) e considerável variação por procedimento em outras (de 5 a 40 oócitos) (PONTES et al., 2011).

As fêmeas da raça Nelore também parecem ter outras características específicas como onda de LH específica e padrões únicos de metabolismo hormonal. Porém, ainda não se tem estabelecido a base fisiológica do número de folículos presentes nestes animais da raça Nelore. Outra hipótese controversa que tem sido sugerida devido à grande recuperação oocitária nos animais da raça Nelore é a renovação folicular ovariana, no entanto, este conceito deve ser melhor investigado antes de ser considerado (PONTES et al., 2011).

Nos animais da raça Girolando, foram encontrados neste estudo uma média total de 16,7 oócitos por OPU (108 OPU/1806 oócitos). Estes resultados foram inferiores aos obtidos por Pontes et al. (2010), que recuperou uma média de 25,44 oócitos por sessão de OPU nos animais da raça Girolando (n = 81, 12492 oócitos em 492 sessões de OPU). Fato este que pode ser explicado pelo presente trabalho possuir a maior parte dos animais da raça Girolando com maior grau de sangue taurino (5/8 Holandês x 3/8 Gir), diferentemente dos animais do trabalho de Pontes et al. (2010) os quais eram 1/2 Gir x 1/2 Holandês e 1/4 Holandês x 3/4 Gir.

Na raça Brangus, aqui apresentada, foram recuperados uma média total de 16,1 oócitos por sessão de OPU (133 OPU/2139 oócitos). Porém, na literatura não foram encontrados trabalhos de PIV em animais oriundos do cruzamento de 5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus* de raças de corte.

Em comparação com o número de oócitos viáveis por sessão de OPU entre as raças deste experimento, percebeu-se que nos animais Nelore CEIP foram recuperados um maior número de oócitos viáveis (16.2), quando comparado aos oócitos viáveis nas raças Brangus (7.3), Nelore (não CEIP) (7.9) e Girolando (9.0). Resultados semelhantes com a raça Nelore (CEIP) foram encontrados por Stroud e Callesen (2012), em um levantamento na PIVE no mundo, onde o autor encontrou uma média de 16 oócitos viáveis por OPU, porém estes resultados são superiores comparados aos encontrados neste presente trabalho com as raças Brangus, Girolando e Nelore (não CEIP). Estes resultados foram considerados inferiores, comparado aos achados de Pontes et al. (2009), que recuperou 23 oócitos viáveis por OPU em fêmeas Nelore, e também inferiores com os de Pontes et al. (2011), que obteve em fêmeas Nelore uma média de 24 oócitos viáveis por OPU. Na raça Girolando, Pontes et al. descreve resultados superiores aos encontrados neste trabalho (média de 20 oócitos viáveis por sessão de OPU).

Comparando a porcentagem de óocitos viáveis por sessão de OPU entre as raças, notou-se que as raças Nelore (CEIP) e Brangus, percebeu-se as mesmas porcentagens (45.5% e 45.2%) respectivamente, porém elas apresentaram médias inferiores relacionadas as obtidas nas raças Nelore (não CEIP) e Girolando (53% e 53.8%) respectivamente. Estes resultados são inferiores comparados e resultados obtido por Pontes et al. (2011), onde foi descrito que fêmeas Nelore apresentaram uma taxa de 75.5% de óocitos viáveis. Pontes et al. (2009) obteve em seu experimento uma taxa de 89% de óocitos viáveis em animais da raça Nelore.

Com relação à produção de embriões por sessão de OPU, obteve-se com este experimento na raça Nelore (CEIP) um número de 4,1 embriões produzidos por OPU, este resultado se mostrou superior quando comparado aos resultados obtidos nas raças Brangus (2.0 embriões/OPU), Nelore (não CEIP) (2.2 embriões/OPU) e Girolando (2.3 embriões/OPU). Resultados encontrados em fêmeas Nelore por Pontes et al. (2011) se mostraram superiores, obtendo uma média de 8 embriões por sessão de OPU, o autor ainda relata em seu trabalho que doadoras com alta produção de óocitos produziram significativamente mais embriões que aqueles de baixa produção de óocitos (PONTES et al., 2011), estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho na raça Nelore (CEIP). Em outro trabalho em animais Nelore, Pontes et al. (2009) obteve uma média de 9 embriões por sessão de aspiração. Porém em fêmeas Girolando, Pontes et al. (2010) obteve uma média de 4.6 embriões por OPU, demonstrando assim uma média de produção de embriões menor em animais Girolando (*Bos indicus* x *Bos tauros*) comparado a raça Nelore (*Bos indicus*). A avaliação da taxa de produção de embriões em relação ao número total de óocitos viáveis não apresentou diferença estatística entre as raças (Nelore CEIP: 25.4%, Brangus: 28.1%, Nelore (não CEIP): 28.4% e Girolando: 25.8%). Pontes et al. 2010, descreve resultados inferiores obtidos em vacas da raça Girolando (23% de embriões). Resultados superiores ao apresentado no presente estudo, foram encontrados por Pontes et al. (2011) e Stroud e Callesen (2012) onde se obteve taxas de 31.4% e 32% respectivamente, entretanto os resultados encontrados por Pontes et al. (2009) são ainda maiores, onde o autor descreve uma taxa de 41% de produção de embriões de acordo com o total de óocitos viáveis.

O número de prenhez por sessão de OPU obtido no presente experimento foi de 0,6 nas raças Brangus, Nelore (não CEIP) e Girolando, entretanto na raça Nelore (CEIP) se obteve um resultado superior estatisticamente de 1,2 prenhez por sessão de OPU, diferentes dos resultados encontrados na raça Nelore por Pontes et al. (2009) (3,5 prenhez/OPU) e Pontes et al. (2011) (3 prenhez/OPU). Pontes et al. (2010) em animais da raça Girolando obteve um resultado semelhante (1,4 prenhez/OPU) aos descritos neste trabalho na raça

Nelore (CEIP), porém foram superiores comparados aos obtidos com a raça Girolando neste experimento. Quanto à taxa de prenhes, neste experimento foram obtidas nas raças Brangus 33.6% de prenhes, Nelore (não CEIP) 28.4%, Girolando 24.9% e Nelore (CEIP) 28.5% de prenhes, não havendo diferença estatística significativa entre as raças. Outros trabalhos na raça Nelore apresentam resultado pouco superiores de 37% (PONTES et al., 2009) e 36% (PONTES et al., 2011), e de 37% de prenhes na raça Girolando (PONTES et al., 2010).

A taxa de prenhes esta diretamente ligada com a qualidade do embrião, à mão de obra técnica e principalmente a qualidade e disponibilidade das receptoras. Alguns trabalhos descrevem baixas taxas de prenhes relacionado a qualidade de receptoras (PONTES et al., 2009; PONTES et al., 2011). Vale ressaltar que ainda são necessários mais estudos relacionados à produção *in vitro* de embriões nessas raças, no intuito de melhorar sua eficiência para escala comercial.

8 CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu dados inéditos de PIVE nas raças sintéticas Brangus e Girolando (*Bos tauros* x *Bos indicus*), e mostraram que esses animais podem ser utilizados em programas de PIVE em larga escala.

Concluimos através do comparativo entre as raças, que a quantidade total de oócitos não variou de acordo com as raças Brangus, Girolando e Nelore, no entanto podemos notar uma grande variação individual de animais da mesma raça, selecionados por programas de melhoramento genético (Nelore CEIP) ou não selecionadas (Nelore não CEIP), onde se obteve nas fêmeas da raça Nelore (CEIP, selecionadas) uma maior produção total de oócitos, oócitos viáveis e embriões por sessão de aspiração.

Este trabalho também demonstrou que animais que passaram por um processo de seleção para produção e fertilidade (Nelore CEIP), através de programas de melhoramento genético, apresentaram uma maior taxa de recuperação de oócitos e conseqüentemente maior produção *in vitro* de embriões.

Sugerimos com os resultados deste trabalho, que os animais sejam submetidos a programas de melhoramento genético que visam uma seleção de fertilidade, para melhoria da PIVE. Sugerimos também que sejam realizados trabalhos com animais Nelore (CEIP), com relação a sua dinâmica folicular, hormonal e contagem populacional de folículos ovarianos.

REFERÊNCIAS

- AMER, P. R.; EMMANS, G. C.; SIMM, G. Breeding objectives for beef cattle in Ireland. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 2, p. 223-239, 2001.
- AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDION, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 381-2
- BAK, A.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Effect of superovulation on reproduction. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, p. 169, 1989. (Abstract).
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565-572
- BASSO, A. C.; SCHNEIDER, C. L.; PONTES, J. H. F. Novas alternativas para aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 4º. Londrina. 2010. p. 205-9
- BAVISTER B. D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. **GAMETE RES**, v. 23, p. 139-158, 1989.
- BECKER, F.; KANITZ, W.; NURNBERG, G.; KURTH, J.; SPITSCHAK, M. Comparison of repeated transvaginal ovum pick-up in heifer by ultrasonographic and endoscopic instruments. **Theriogenology**. v. 46, p. 999-1007, 1996.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal Reproduction Fertility**. v. 38, p. 87-98, 1989.
- BLASCHI, W.; ANDRADE, E. R.; NONATO JR. I.; PONTES, J. H. F.; ERENCO JR, J.C.; UVO, S.; SENEDA, M. M. Pluset prior follicle aspiration: Impact on *in vitro* embryo production in *Bos indicus* cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 186, 2004. (Abstract)
- BOLS, P. E. J.; SOOM, A.V.; VANROOSE, G.; KRUIF, A. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donors cows: Preliminary results. **Theriogenology**, v. 45, p. 359, 1996a.

BOLS, P. E. J.; VAN SON, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M, KRUIF, A. Effects of aspiration vacum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.1001-14, 1996b.

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

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; VICK DONA, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, .M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 101, p. 147-58, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Bovinos e bubalinos**. [200-]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20%282%29%281%29.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2013.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal Reproduction Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BUNGARTZ, L.; HAHN, L. A.; NEIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-75, 1995.

CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULEON, J. Total Follicular Populations in Ewes of High and Low Ovulation Rates. **Journal Reproduction Fertility**, v. 55, p. 27-36, 1979.

CORMACK, D. H. O sistema reprodutor feminino. In: CORMACK, D. H. **Ham Histologia**, 9. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , 1991. p. 485-508

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 33, p. 55-73, 1991.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology Reproduction**, v. 15, p. 555-560, 1976.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in reproductive endocrinology**, v. 4, p. 233-54, 1986.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS C. M.; PINHEIRO O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-505, 1997.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology Reproduction**, v. 50, p. 225-32, 1994.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1998. p. 237-40

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-30, 1989.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S.; Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 261-91

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International: *Raven Press*, 1994. p. 4349

HAFEZ, E. S. E. Anatomy of Female Reproduction. In: HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. 6. ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1996. p. 20-58,

HANEKAMP, W. J. A. Transfer of beef embryos in dairy cows: influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. **Reproduction Domestic Animal**. v. 34, p. 459-63, 1999.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, p. 131-8, 1999.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-52, 1995.

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

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BEKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-26, 1995.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BEKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **The Veterinary Quarterly**, v. 2, n. 16, p. 78-80, 1994.

INGRAN, D. L. Atresia. In: ZUCKERMAN, S. The ovary. **Academic Press**, New York, p. 247-273, 1962.

IRELAND, J. J. Control of Follicular Growth and Development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p. 39-54, 1987.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 409-34

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, p. 527-535, 1993.

KRUIP, T. A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-84, 1994.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology Reproduction**, v. 64, p. 171-8, 2001.

LÔBO, R. B.; BEZERRA, L. A. F.; OLIVEIRA, H. N. **Avaliação genética de animais jovens, touros e matrizes**. Ribeirão Preto: GEMAC — Departamento de Genética – FMRP - USP, 2000. 90 p.

LUCCI, C. M., AMORIM, C. A., RODRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R., BÁO, S. N., SILVA, J. R. V.; GONÇALVES, P. B. D. Study of preantral follicle population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 223-36, 1999.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fert.**, v. 81, p. 301-307, 1987.
MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Início do desenvolvimento humano. In: MOORE, K.L. e PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 13-38

PARCKERT, L.; GALLO, S. B. Uma abordagem sobre os principais programas de melhoramento genético do Brasil. **Caderno de pós-graduação da FAZU**. v. 2, 2011.
(Resumo)

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

PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; FONSECA, C. G.; PENNA, V. M.; PEREIRA, C. S. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 567-74, 2006.

PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; SUYAMA, E.; CARVALHO, M. R. S.; PENNA, V. M. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 67, p. 287–92, 2007.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys**, v. 16, n. 3, p. 271-8, 1976.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, R. A.; KRUIP, .A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-62, 1988.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, A. M.; WURTH, Y. A.; VAN BENEDEN, .H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, p. 19-24, 1991.

PONTES, J. H. F. K.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-55, 2010.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-46, 2011.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-97, 2009.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 57-58

RUSSE, I. Oogenesis in Cattle and Sheep. **Bibl. Anat.**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants, **Rec. Vét.**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SCARAMUZZI, R. J., ADAMS, N. R., BAIRD, D. T., CAMPBELL, B. K., DOWNING, J. A., FINDLAY, J. K., HENDERSON, K. M., MARTIN, G. B., MCNATTY, K. P., MCNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 459-78, 1993.

-
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. **Animal Reproduction Science**, V. 67, p. 37-43, 2001.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: Revisão de literatura. **Semina**, v. 23, n. 1, p. 101-10, 2002.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA J. A.; NASCIMENTO, A. B. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1435-40, 2003.
- SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, p. 1051-7, 2011.
- STROUD, B.; CALLESEN, H. Declaração a IETS sobre as estatísticas mundiais de transferência de embriões para 2010. ANAIS DA XXVI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 26. Foz do Iguaçu, 2012. p. 111-7
- VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum Pick Up and *In vitro* Production in the bovine after use in several generations: 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-25, 2006.
- WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. **The physiology of reproduction**. New York, Raven Press, 1988. p. 69-101
- WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V. Aspectos comercial de embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 293-301
- WILLET, E. L.; BLACK, W. G., CASIDA, L. E., STONE, W. H., BUCKNER, P. J. Successful transplantations of fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p. 247, 1951.