

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
ISABELA CARVALHO SIMÕES

**FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS, UTILIZANDO-SE SÊMEN SEXADO**

FORMIGA - MG
2019

ISABELA CARVALHO SIMÕES

FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS, UTILIZANDO-SE SÊMEN SEXADO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do UNIFOR - MG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Telma da Mata Martins

Coorientador: Fabiano Santos Junqueira

FORMIGA – MG

2019

Isabela Carvalho Simões

FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS, UTILIZANDO-SE SÊMEN SEXADO

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Medicina Veterinária
do UNIFOR - MG, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Medicina
Veterinária

Orientadora: Dra. Telma da Mata Martins

Coorientador: Dr. Fabiano Santos Junqueira

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Telma da Mata Martins

Dra. Mariana André Pompeu

Me. Leonardo Trindade Ituassu

Formiga, 09 de Julho de 2019.

“Dedico esta conquista a meus pais (Josseane e Neisson), a minha irmã (Isadora), a minha madrinha (Jaciara), aos meus avós (Maria e Waldir, Gloria e Eudiene), ao meu namorado (Alexandre) e a todos que torceram por mim durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais (Neisson e Josseane) por tudo que fizeram e fazem por mim, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a minha irmã (Isadora), meus avós: Eudiene, Glória, Waldir e Maria, por todo amor que recebi, e por compreenderem minha ausência em busca de um sonho.

Agradeço em especial a minha madrinha (Jacira) que não mediu esforços para me ajudar a chegar a até aqui, esteve sempre comigo comemorando minhas vitórias desde pequenininha. Aos meus priminhos (Victor e bebê que está a caminho) por me proporcionarem momentos de alegria durante dias difíceis.

Ao meu amor Alexandre, pelo otimismo e carinho em momentos que necessitei de apoio.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Telma da Mata Martins, pelo apoio e amizade na realização deste trabalho, e pela paciência em me orientar com carinho.

Aos meus professores Dr. Leonardo Borges Acurcio, Me. Diogo Joffily e Dr. Fabiano Santos Junqueira, pelo conhecimento compartilhado e dedicação. Minha eterna admiração.

Agradeço aos meus colegas, aqueles que se tornaram grandes amigos, em especial minha grande amiga Leticia.

RESUMO

The embryo transfer technique expands every year in Brazil, being considered a strategy to increase the reproductive rates and the genetic gain of the herds. The objective of this study was to evaluate the data provided by a commercial laboratory for the production of bovine embryos *in vitro* using sexed semen. The effect of the season of the year on the quantity and viability of the aspirated oocytes and the embryos produced from January to December 2017 was evaluated. The performance of the Veterinarian who performed follicular aspiration was also verified. A total of 1,296 follicular aspiration procedures were performed, 15,858 oocytes (mean of 12.2 oocytes per aspiration) were aspirated, resulting in the production of 3,779 embryos (23.8% of oocytes aspirated). The results were submitted to statistical analysis, considering the level of significance of 5%. In relation to the time of year, only the cleavage rate presented variation, being significantly lower in the spring ($P = 0.0150$). However, in relation to the efficiency of the Veterinarian who performed the follicular aspiration procedure, different performances were observed in relation to the number of oocytes considered viable in the field ($P = 0.001$) and in the laboratory ($P = 0.0002$), in the cleavage ($P = 0.0008$); number of embryos sent to the field ($P = 0.0130$), and the total rate of embryos produced ($P = 0.0376$). In general, the efficiency of the Veterinarian responsible for follicular aspiration is not reported as one of the factors that directly influence PIVE results, however, this reality should be reassessed and studied, deserving greater importance on the part of researchers.

Palavras chave: Bovinos, oócitos, produção *in vitro* de embriões

ABSTRACT

The embryo transfer technique expands every year in Brazil, being considered a strategy to increase the reproductive rates and genetic gain of the herds. The objective of this study was to evaluate the data provided by a commercial laboratory for the production of bovine embryos *in vitro* using sexed semen. The effect of the season of the year on the quantity and viability of the aspirated oocytes and the embryos produced from January to December 2017 was evaluated. The performance of the Veterinarian who performed follicular aspiration was also verified. A total of 1,296 follicular aspiration procedures were performed, 15,858 oocytes (mean of 12.2 oocytes per aspiration) were aspirated, resulting in the production of 3,779 embryos (23.8% of oocytes aspirated). The results were submitted to statistical analysis, considering the level of significance of 5%. In relation to the time of year, only the cleavage rate presented variation, being significantly lower in the spring ($P = 0.0150$). However, in relation to the efficiency of the Veterinarian who performed the follicular aspiration procedure, a significant influence was observed in the amount of viable oocytes in the field ($P = 0.001$) and in the laboratory ($P = 0.0002$), in the cleavage rate ($P = 0.0008$), the number of embryos sent to the field ($P = 0.0130$), and the total rate of embryos produced ($P = 0.0376$). In general, the efficiency of the Veterinarian is not considered one of the factors that directly influence the results of PIVE, however, this reality must be reassessed and studied, deserving greater importance on the part of the researchers.

Keywords: Bovine, oocytes, *in vitro* production of embryos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de oócitos viáveis observados a campo de acordo com a época do ano.....	27
Tabela 2 - Número de oócitos viáveis observados no laboratório de acordo com a época do ano.....	27
Tabela 3 - Taxa de clivagem de acordo com a época do ano.....	28
Tabela 4 - Total de embriões produzidos <i>in vitro</i> e media de embriões por doadora de acordo com a época do ano.....	29
Tabela 5 - Número de embriões enviados a campo de acordo com a época do ano.....	30
Tabela 6 - Número de embriões desprezados de acordo com a época do ano.....	30
Tabela 7 - Taxa de produção de embriões de acordo com a época do ano.....	31
Tabela 8 - Número de aspirações de acordo com o médico veterinário.....	32
Tabela 9 - Número de oócitos viáveis a campo por doadora de acordo com o médico veterinário.....	32
Tabela 10 - Número de oócitos viáveis por doadora de acordo com o médico veterinário.....	32
Tabela 11 - Taxa de clivagem de acordo com o médico veterinário.....	33
Tabela 12 - Total de embriões produzidos <i>in vitro</i> de acordo com o médico veterinário.....	33
Tabela 13 - Número de embriões enviados a campo de acordo com o médico veterinário.....	34
Tabela 14 - Número de embriões desprezados de acordo com o médico veterinário.....	34
Tabela 15 - Taxa de produção de embriões de acordo com o médico veterinário.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento do folículo (foliculogênese) e corpo lúteo.....	5
Figura 2 - Dinâmica folicular e fases do ciclo estral da fêmea bovina.....	6
Figura 3 - Exemplo de protocolo hormonal adotado na IATF e na TETF.....	12
Figura 4 - Células do <i>cumulus oophorus</i> e oócitos de boa qualidade.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BSA	Albumina sérica bovina
CL	Corpo Lúteo
eCG	Gonadotrofina Coriônica equina
EGF	Fator de crescimento epidermal
FAO	Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio foliculo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de crescimento
IP	Intervalo de partos
LH	Hormônio luteinizante
M-TE	Meio de transferência de embrião
MOET	<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i>
OPU	Ovum pick up
PBS	Tampão fosfato-salino
PEV	Período voluntário de espera
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PGF2 α	Prostaglandina
SBTE	Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião
SRB	Soro fetal bovino
TE	Transferência de embrião
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1	Cenário atual produção de leite e da eficiência reprodutiva no Brasil	2
2.2	Ciclo estral bovino.....	3
2.3	Dinâmica folicular em bovinos.....	4
2.4	Controle hormonal do ciclo estral.....	6
2.4.1	Hormônio liberador de gonadotrofina.....	6
2.4.2	Hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante.....	6
2.4.3	Estrógeno e progesterona.....	7
2.4.4	Prostaglandina F2 α	8
2.5	Manipulação do ciclo estral por meio de protocolos hormonais....	8
2.5.1	Hormônios Sintéticos.....	8
2.5.1.1	Análogos do GnRH	2.5.1.2 Progestágenos e ésteres de estrogênio. 8
2.5.1.2	Progestágenos e ésteres de estrogênio.....	9
2.5.1.3	Agentes luteolíticos.....	9
2.5.1.4	Gonadotrofina coriônica equina.....	9
2.6	Biotécnicas reprodutivas adotadas em rebanhos de leite.....	10
2.6.1	Inseminação artificial (IA).....	10
2.6.2	Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	10
2.6.3	Transferência de embrião (TE).....	11
2.6.4	Transferência de embrião em tempo fixo (TETF).....	11
2.6.5	Sexagem espermática e adoção de sêmen sexado na TE.....	13
2.7	Técnica de produção <i>in vitro</i> de embriões.....	13
2.7.1	Seleção de doadoras.....	13
2.7.2	Estimulação folicular das doadoras.....	14

2.7.3	Aspiração folicular guiada por ultrassom.....	15
2.7.5	Qualidade do oócito.....	16
2.7.6	Transporte de oócitos.....	17
2.7.7	Maturação <i>in vitro</i>	18
2.7.8	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	19
2.7.9	Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	20
2.7.10	Qualidade de embriões.....	20
2.7.11	Seleção de receptoras.....	21
2.7.12	Inovulação do embrião.....	22
3	Materiais e métodos.....	23
3.1	Local.....	23
3.2	Manejo das vacas doadoras.....	23
3.3	Aspiração folicular classificação e transporte dos oócitos imaturos	24
3.4	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	24
3.5	Transporte dos embriões.....	25
3.6	Manejo das receptoras.....	25
3.7.1	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO.....	26
6.	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A utilização da técnica de transferência de embrião (TE) cresce a cada ano no Brasil, sendo uma das estratégias para elevar as taxas reprodutivas dos rebanhos. A grande relevância da técnica é a capacidade de aumentar significativamente o número de crias que uma fêmea pode produzir, comparado ao obtido naturalmente durante sua vida útil (NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010).

Ao nascimento, uma fêmea contém mais de 100.000 oócitos nos ovários. Naturalmente, ao longo da sua vida reprodutiva, somente 0.01% destes se tornam viáveis, levando a produção média de até dez crias. Sendo assim, biotecnias reprodutivas como a MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*), tem como objetivo melhorar o aproveitamento dos gametas de fêmeas consideradas de alto valor genético (GORDON, 2003).

A MOET foi criada na década de 70, e consiste em estimular o crescimento folicular por meio da aplicação de hormônios, coletando-se os oócitos para produção *in vitro* de embriões, os quais são transferidos para o útero de fêmeas receptoras, possibilitando a obtenção anual de mais de 100 produtos por doadora (MERTON et al., 1997). Em 2013, o Brasil produziu 42% do total de embriões produzidos no mundo, chegando a mais de 500 mil embriões (BLONDIN, 2015).

A adoção de sêmen sexado na PIVE tem como objetivo acelerar o melhoramento genético dos rebanhos de leite ou corte, aumentando-se a produção de fêmeas e machos, respectivamente. Porém, o processo de sexagem espermática diminui a fertilidade do sêmen, podendo influenciar no rendimento da PIVE (ARAUJO et al., 2013).

Além da qualidade do sêmen, diversos outros fatores podem influenciar direta ou indiretamente na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (BECHER et al., 2018). Dentre outros fatores relacionados às doadoras, citam-se: raça, categoria, número de partos, fase do ciclo estral, condição corporal, e estação do ano que foi realizada a aspiração. Fatores inerentes às receptoras afetam a taxa de gestação dos embriões transferidos (MELLO et al., 2016).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da estação do ano e do técnico que realizou o procedimento de aspiração folicular, nos resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, a partir da análise de dados de um laboratório comercial, obtidos durante o ano de 2017.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cenário atual da produção de leite e da eficiência reprodutiva no Brasil

O leite é considerado um dos produtos de maior relevância na agropecuária brasileira, tendo efeito direto na produção de alimentos, fornecimento de empregos e geração de renda (EMBRAPA, 2016).

Souza et al. (2009) expõem que desde a década de 90 a pecuária de leite brasileira tem passado por notáveis mudanças, verificando-se que os produtores se tornaram mais competitivos, e passaram a buscar inovações para o sistema, com destaque para a produção de leite em grande escala, agregando qualidade e valorização desse produto.

De acordo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2017 o País produziu 33,5 bilhões de litros de leite, o que colocou o país em quarto lugar no ranking de produção mundial. Entre os estados, Minas Gerais se posiciona como o maior produtor, seguido por Rio Grande do Sul e Paraná.

No Brasil, a produção de leite aumentou significativamente nas últimas décadas, devido a um conjunto de fatores, incluindo a seleção genética dos animais. Em compensação, a queda na eficiência reprodutiva tem limitado o desenvolvimento da pecuária leiteira. O País possui 80,6 milhões de vacas em fase reprodutiva, porém sua produção é de apenas de 55,2 milhões/ano (ANUALPEC, 2015).

A eficiência reprodutiva das fêmeas leiteiras tem influenciado diretamente na lucratividade da propriedade. Após o parto, fêmeas de alta produção requerem mais tempo para retornar à reprodução, aumentando assim o período voluntário de espera (PEV) e automaticamente o intervalo de partos (IP) (SARTORI, 2007).

O decréscimo na fertilidade dos rebanhos leiteiros é uma situação mundial, que gera notável preocupação. De acordo com Gatiús (2003), a cada 1.000 Kg de aumento na produção de leite durante a lactação da fêmea bovina, ocorre uma queda de 6% na taxa de concepção.

Para aumentar o desempenho reprodutivo dos rebanhos, diversas biotécnicas têm sido adotadas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vitro* de embriões (PIVE), e a transferência de embriões (TE). O emprego adequado dessas biotecnias requer amplo conhecimento sobre as particularidades da fisiologia reprodutiva da fêmea bovina (BARUSELLI et al., 2016).

2.2 Ciclo estral bovino

O ciclo estral é caracterizado pelo período entre um estro e outro, contendo os estágios de proestro, estro, metaestro e diestro. O período de duração do ciclo estral é em torno de 21 dias (BENITES; BARUSELLI, 2011).

De acordo com Macmillan e Burke (1996), o ciclo estral é dividido em duas fases, folicular e luteínica. A primeira compreende o proestro e o estro, com ação predominante do estrógeno. A segunda compreende o metaestro e o diestro, e o principal hormônio dessa fase é a progesterona.

O proestro tem duração de dois a três dias, e é o estágio no qual ocorre o desenvolvimento folicular, a partir do estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), que promove o crescimento inicial dos folículos, e do hormônio luteinizante (LH), que é responsável pela maturação, crescimento final dos folículos. À medida em que os folículos se desenvolvem, ocorre aumento dos níveis de estradiol na circulação (GRUNERT, 2013).

No estro, o folículo atinge seu diâmetro máximo e o estradiol, altas concentrações na corrente sanguínea, levando a alterações no comportamento da fêmea, que passa a aceitar a monta do macho e de outras fêmeas. A duração do estro varia de 12 a 18 horas (BALL; PETERS, 2006).

Em torno de 12 horas após o final do estro, já no metaestro, ocorre a ovulação. Esse estágio dura dois a três dias, e se caracteriza pelo aumento dos níveis circulantes de progesterona devido à reorganização das células foliculares para formação do corpo lúteo, o que ocorre sob estímulo do LH (EMBRAPA, 1991; GRUNERT, 2013).

O último estágio do ciclo estral é o diestro, sendo caracterizado pela presença de um corpo lúteo funcional e por altos níveis de progesterona na corrente sanguínea. Sua duração é de 14 a 16 dias (BENITES; BARUSELLI, 2011). Ao final do diestro, caso a fêmea não tenha se tornado gestante, ocorre a lise do corpo lúteo, causada pela prostaglandina, de origem endometrial. A concentração de progesterona diminui, levando ao início de um novo ciclo estral. Caso a fêmea esteja gestante, a presença do embrião no útero bloqueia a liberação de prostaglandina, impedindo que aconteça a luteólise, permitindo assim, a persistência do corpo lúteo e, conseqüentemente, a manutenção da gestação (GRUNERT, 2013).

2.3 Dinâmica folicular em bovinos

O desenvolvimento dos folículos, também conhecido como foliculogênese, compreende uma sequência de eventos, que incluem a formação, o crescimento e a maturação dos folículos, até a ovulação (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Na figura 1, estão ilustradas essa sequência de eventos.

São encontrados em maior quantidade nos ovários os folículos primordiais, mantidos em estado de quiescência, constituindo uma reserva folicular formada na fase fetal. Na fase de pré-puberdade, alguns desses folículos são ativados, e iniciam seu desenvolvimento a partir da ação de hormônios e fatores de crescimento. Os oócitos contidos em seus interior permanecem na fase de prófase, da primeira meiose – prófase I (ROSSETTO et al., 2011).

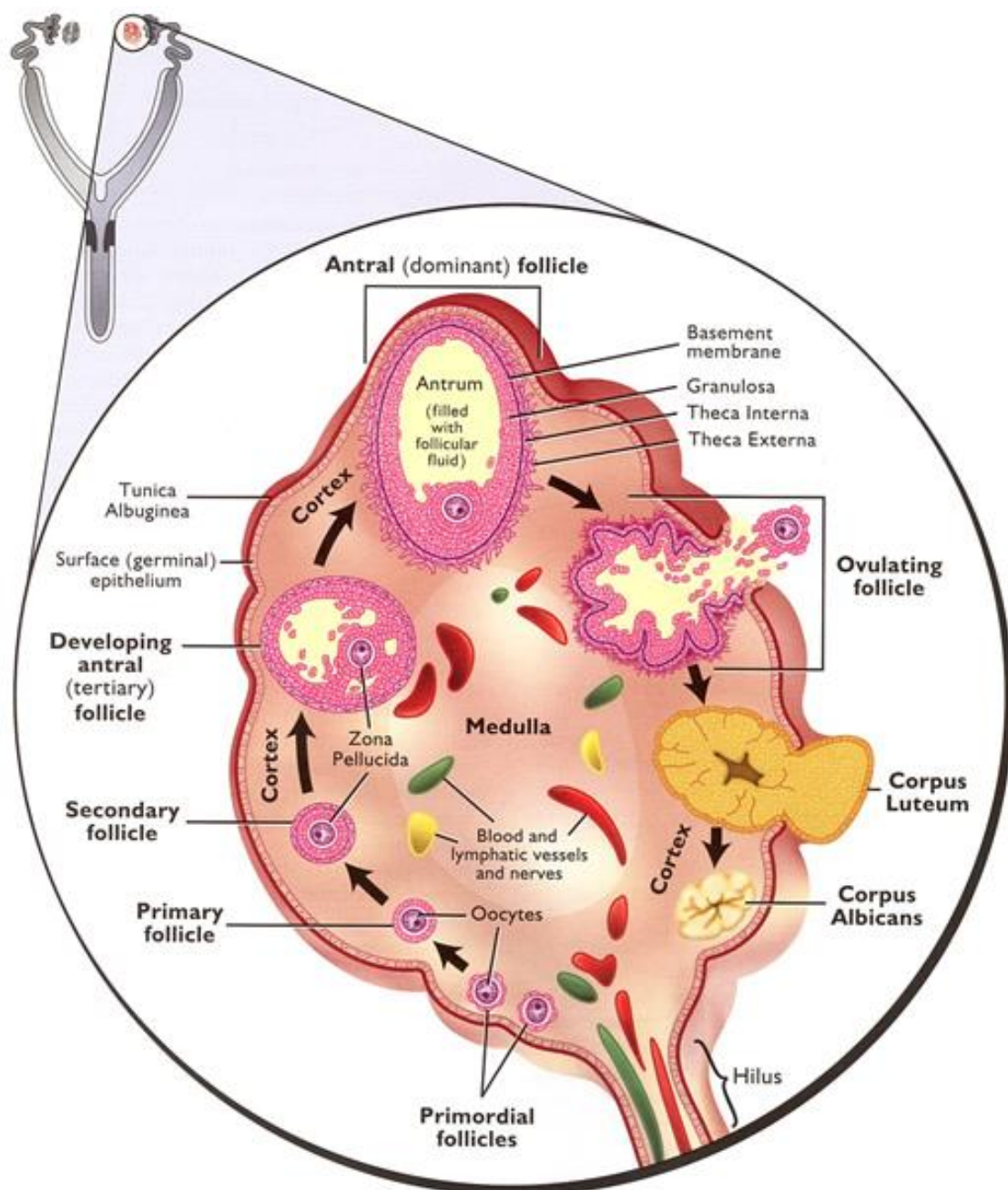
Sob estímulo das gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH, os folículos em desenvolvimento passam pelas fases de recrutamento, seleção e dominância. Vários folículos são recrutados, porém, somente um atinge a dominância. Os demais regredem. O folículo dominante atinge tamanho pré-ovulatório, podendo ovular ou sofrer atresia, dependendo da fase do ciclo estral (ADAMS, 1994). Durante o ciclo estral, são observadas duas a três ondas foliculares (FIG. 2). A onda ovulatória é caracterizada pela onda que vai gerar a ovulação, sendo a última onda do ciclo (MELLO et al., 2013). O folículo é responsável por garantir um ambiente favorável para o desenvolvimento e maturação adequada do oócito, até o momento da ovulação (PRESTES, ALVARENGA; 2006).

Os folículos apresentam uma camada interna formada por células da granulosa - células esteroideogênicas, que recebem estímulo do FSH. E possuem também uma camada dupla mais externa, formada de células da teca, que respondem ao LH. As células da granulosa e da teca, revestem o oócito, e a medida em que os folículos se desenvolvem, as células da granulosa se expandem, contribuindo para a formação de uma cavidade denominada antro. A formação do antro torna possível a visualização ultrassonográfica dos folículos terciários, a partir de 3mm de diâmetro, ainda na fase de recrutamento da onda folicular (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

Podemos classificar os folículos em dois grupos: pré antrais e antrais. Os folículos pré-antrais compreendem os folículos primordiais, primários e secundários,

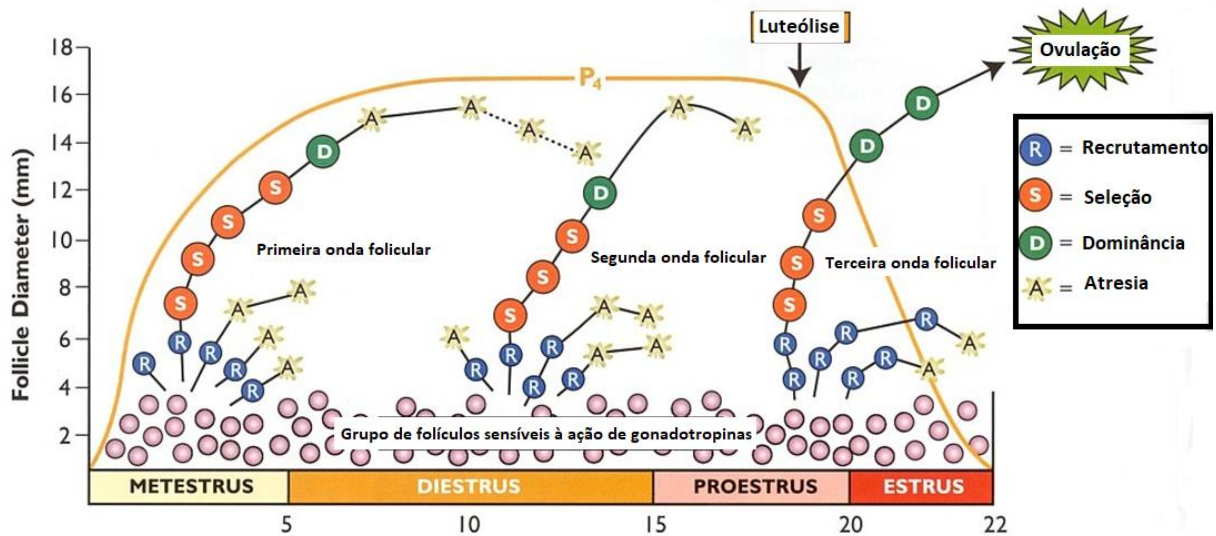
e dependem de fatores de crescimento para se desenvolver. Os folículos antrais já são responsivos às gonadotropinas, e compreendem os folículos terciários e pré-ovulatórios (MAGALHÃES et. al., 2012). Na fase de recrutamento da onda folicular, um grupo de folículos terciários ainda com pequeno diâmetro, já são responsivos ao FSH (SIQUEIRA e LEAL e OBA, 2009).

Figura 1 - Desenvolvimento do folículo (foliculogênese) e corpo lúteo



Fonte: Senger (2003)

Figura 2 – Dinâmica folicular e fases do ciclo estral da fêmea bovina



2.4 Controle hormonal do ciclo estral

2.4.1 Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)

O hipotálamo é um segmento do cérebro, localizado na porção do terceiro ventrículo. O hipotálamo e a adenohipófise, conhecida também como hipófise anterior, possuem ligações vasculares por meio da artéria hipofisária superior e inferior, a partir desta artéria é formada uma rede de capilares, pelo qual o sangue irá passar fluindo para o sistema porta hipotálamo-hipofisário, fazendo com que os hormônios produzidos pelo hipotálamo cheguem até a hipófise. O principal hormônio hipotalâmico regulador da reprodução é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelos axônios, os quais realizam as sinapses com os capilares do hipotálamo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O GnRH é um hormônio proteico produzido pelo hipotálamo, que possui a função de estimular a adenohipófise, agindo em células especializadas na secreção dos hormônios gonadotrópicos, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), liberação realizada pela (HAFEZ, 2004).

2.4.2 Hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)

A hipófise é dividida em três lobos: lobo anterior chamado de adenohipófise; lobo intermediário; e um lobo posterior, também conhecido como neurohipófise. São produzidos pela hipófise dois hormônios que participam e são importantes para a

reprodução, o FSH e o LH, estes hormônios vão estimular o desenvolvimento dos folículos e levar a ovulação (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

O FSH é um hormônio glicoproteico, produzido pelos gonadotrofos, células especializadas da adenohipófise, responsivas ao estímulo de GnRH (BALL; PETERS, 2006).

Como citado por Nogueira et al. (2011), a principal função do FSH é estimular o crescimento e a maturação inicial dos folículos. Esse estímulo é feito através da enzima aromatase, que atua nas células da granulosa, fazendo com que está passe a converter hormônios andrógenos (sintetizados pela teca interna) em estrógeno. Os folículos responsivos, ou seja, que possuam maior quantidade de receptores para FSH, irão produzir grandes quantidades de estrógeno, se tornando posteriormente folículos dominantes.

O LH também é um hormônio glicoproteico, produzido pelos gonadotrofos, e tem a função de realizar a maturação final do folículo, levando a ovulação. Também auxilia na formação e na manutenção do corpo lúteo, ao proporcionar estímulos enzimáticos nas células da teca interna, transformando progesterona em andrógenos (BALL; PETERS, 2006).

2.4.3 Estrógeno e progesterona

Estrógeno e progesterona são hormônios esteroides de grande importância na reprodução, sendo produzidos pelo ovário, tendo como base o colesterol (BALL E PETERS, 2006). O estradiol é conhecido como estrógeno primário, sua produção nas células da granulosa se dá através de precursores androgênicos. A função principal dos estrógenos é induzir a fêmea a manifestar o comportamento de estro (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O corpo hemorrágico, formado após a ovulação tem suas células reorganizadas e diferenciadas. Células da granulosa e células da teca passam se luteinizam e passam a secretar progesterona, após a diferenciação em corpo lúteo (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014). Segundo Hafez (2004), o hormônio progesterona auxilia na manutenção da gestação, preparando o útero para esse evento, impedindo as contrações uterinas, e aumentando secreções das glândulas endometriais. A progesterona também realiza *feedback* negativo sobre o GnRH pelo hipotálamo, inibindo a secreção de gonadotrofinas.

2.4.4 Prostaglandina F2 α

A função da prostaglandina é causar a regressão do corpo lúteo (luteólise), fazendo parte do final do ciclo estral, possibilitando o início de um novo ciclo, na ausência de uma gestação (HAFEZ & HAZEZ, 2004).

A prostaglandina F2 α é sintetizada no útero, especificamente pelo endométrio no final do diestro. A presença de um embrião, sinalizada pela proteína interferon- τ (IFN τ) é o estímulo necessário para inibir a produção de PGF2 α (HAFEZ, 2004).

2.5 Manipulação do ciclo estral por meio de protocolos hormonais

Segundo Binelli et al. (2006), a partir do advento da ultrassonografia, foi possível obter um conhecimento mais profundo sobre o funcionamento do ciclo estral, o que contribuiu para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas.

A manipulação do ciclo estral consiste na intervenção no ciclo estral por meio de mecanismos exógenos, como os protocolos hormonais que têm sido desenvolvidos com o objetivo de controlar o recrutamento, a seleção, a ovulação e a atresia folicular. Hormônios sintéticos, análogos dos hormônios naturais citados anteriormente, são utilizados para manipular o ciclo estral da fêmea bovina.

2.5.1 Hormônios sintéticos

2.5.1.1 Análogos do GnRH

O GnRH é adotado em protocolos hormonais com a função de estimular a secreção de FSH ou LH, dependendo da fase do ciclo estral. Atinge seu nível sérico máximo cerca de uma a duas horas após a aplicação (BENITES; BARUSELLI, 2011). Segundo Nogueira (2011) a utilização de GnRH exógeno no momento da inseminação aumenta a taxa de gestação em fêmeas com baixa fertilidade, devido ao aumento da liberação de LH, proporcionando maior chance do folículo ovular.

Alguns exemplos de análogos do GnRH encontrados comercialmente são: SINCROFORTE® (Acetato de buserelina) e FERTAGYL® (gonadorelina) (ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO, 2015).

2.5.1.2 Progestágenos e ésteres de estrogênio

A adoção de análogos da progesterona nos protocolos hormonais tem o objetivo de simular a presença de um corpo lúteo, e permitir um maior controle da onda folicular iniciada em ambiente com elevada concentração de estrogênio (MORAES et al., 2014). O estro é observado dois a três dias após a retirada da progesterona, são utilizados hormônios associados com intuito de sincronizar as ovulações (ROCHE, 1996). Alguns exemplos de progestágenos disponíveis no mercado são SINCROGEST® e CIDR® (ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO, 2015), que são implantes intravaginais.

Ésteres de são adotados em associação com progestágenos, e no início do protocolo hormonal, atuam promovendo a atresia do folículo dominante, levando a indução do recrutamento de uma nova onda folicular (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). Benites e Baruselli (2011) relataram a existência de vários ésteres disponíveis comercialmente, sendo alguns exemplos: benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (CE).

2.5.1.3 Agentes luteolíticos

São empregados com o intuito de promover a luteólise antecipada, diminuindo as taxas de progesterona, com crescente elevação dos níveis de FSH e LH (BENITES; BARUSELLI, 2011). Nos protocolos hormonais, a aplicação de PGF_{2α} no instante que é feita a retirada do implante de progesterona, causa diminuição na concentração desse hormônio, de forma semelhante à fisiologia do final do período de diestro (SÁ FILHO, 2012).

Agentes luteolíticos comerciais são: CIOSIN® (Cloprostenol sódico), LUTALYSE® (Dinoprost trometamina) e SINCROCIO® (Cloprostenol sódico) (ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO, 2015).

2.5.1.4 Gonadotrofina coriônica equina (eCG)

A eCG é uma substância produzida pelas éguas, no terço inicial da gestação, tendo como função natural a criação de corpos lúteos suplementares (MURPHY, 2012). Sua utilização em vacas tem como principal atividade, exercer função

semelhante aos hormônios FSH e LH (SOUZA et al., 2009). Apresenta boa utilização em animais que após o parto apresentam baixo escore de condição corporal, possibilitando assim aumento no desenvolvimento do folículo ovulatório, e, conseqüentemente, elevação da taxa de ovulação (NÚNEZ-OLIVEIRA et al., 2014).

Alguns exemplos comerciais são FOLLIGON®, NOVORMON® e SINCROeCG® (ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO, 2015).

2.6 Biotécnicas reprodutivas adotadas em rebanhos de leite

2.6.1 Inseminação artificial (IA)

O termo inseminação artificial resulta na aplicação de gametas masculinos no trato reprodutivo da fêmea, por meio de um método artificial. A técnica de inseminação foi disseminada no Brasil nos anos 70, devido ao esforço conjunto de veterinários, técnicos e produtores (ALVAREZ, 2009; SEVERO, 2015).

A IA é uma ferramenta de propagação da genética, possibilitando maior aproveitamento de reprodutores que possuem características zootécnicas superiores. Dentre suas vantagens, é uma técnica simples, fácil de ser utilizada, e possui custo relativamente baixo (ALVAREZ, 2009; SEVERO, 2015).

Para obter sucesso na técnica de inseminação, é fundamental que a detecção de cio seja eficaz (CARVALHEIRA et al., 2016). A baixa taxa de detecção de cio é um fator limitante para a técnica (VIREQUE et al., 2009). De acordo com Nebel (2003), baixas taxas de detecção de cio implicam em baixas taxas de serviço, o que impacta negativamente nas taxas de gestação.

2.6.2 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

A técnica de inseminação artificial em tempo fixo tem como principal objetivo contornar os problemas da necessidade de observação de cio da IA convencional, adotando-se protocolos hormonais para sincronizar o cio e induzir a ovulação de um grupo de fêmeas, o que permite prever o momento da inseminação, sem necessidade de observar cio (GODOI, C.R., SILVA, E.F.P. E PAULA, 2010). Dentre suas vantagens, podemos observar que a técnica permite inseminar uma maior quantidade de fêmeas em um menor espaço de tempo (EMBRAPA, 2002).

2.6.3 Transferência de embrião (TE)

A técnica de transferência de embriões (TE) compreende na coleta de embriões no útero da fêmea sendo essas doadoras, com posterior implantação desse embrião no útero de vacas que são chamadas de receptoras, as quais serão responsáveis pela gestação (SALLES, 1998; FONSECA, 2001; GONÇALVES et al., 2002; RODRIQUES, 2003; Moraes et al., 2002).

Segundo Gonçalves et al. (2002) a finalidade da técnica é aumentar a quantidade de crias produzidas por uma fêmea e um touro de alto valor genético.

A transferência de embrião nada mais é que a extração de óvulos já fecundados de uma fêmea doadora, a qual deve ser comprovadamente de boa genética. Posteriormente, esses embriões são depositados no útero de fêmeas receptoras que por sua vez não precisam ter pré-requisito genético, mas devem ser sadias e capazes de levar uma gestação até o final, além de amamentar e criar o produto (FERRAZ, 2003).

Segundo Fernandes & Viana (1995), em um programa de TE, as doadoras são o foco de todas as preocupações. Em contrapartida, ignora-se a importância das receptoras, que representam um ponto crítico para efetivação da técnica. A taxa de prenhez nos programas de TE geralmente gira em torno de 55%, tendo a perda de praticamente metade dos embriões, o que pesa negativamente na utilização da TE.

No Brasil os primeiros relatos da utilização da técnica foram por volta do ano de 1977. Alguns anos depois, já na década de 80, foi criada a SBTE (Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões), que hoje atende pelo nome de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (GONÇALVES et al, 2002).

2.6.4 Transferência de embrião em fixo (TETF)

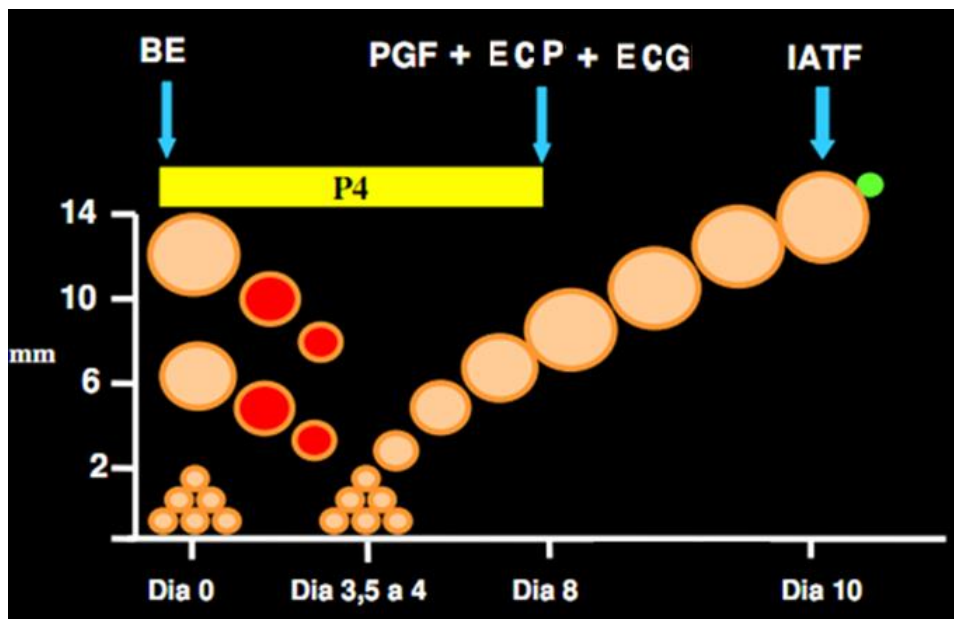
As biotécnicas que necessitam de observação de cio muitas vezes apresentam maior grau de dificuldade para serem executadas, principalmente em relação ao manejo ao se trabalhar com volume elevado de animais. Sendo assim, de forma semelhante à IA, foi criada uma técnica de TE em tempo fixo, utilizando-se protocolos hormonais para realizar a sincronização prévia da ovulação (FIG. 3).

No Brasil utilizam-se frequentemente protocolos hormonais com aplicação de estrógenos (ésteres de estradiol) e progéstágenos em forma de implantes

auriculares ou vaginais. Na retirada do implante, além da prostaglandina (PGF $_{2\alpha}$), estrógenos são utilizados para induzir uma nova ovulação. No momento da retirada do implante, a aplicação de eCG pode aumentar a taxa de crescimento do folículo dominante, e conseqüentemente, a chance de ocorrer a ovulação (ALVAREZ, RAFAEL E SALAS, 2016).

No caso da TETF, o embrião é transferido para o útero de fêmeas receptoras em torno de sete dias após a data prevista da ovulação, ou seja, 17 a 18 dias após o início do protocolo hormonal (FIG. 3). Nessa ocasião, o animal deve apresentar um corpo lúteo funcional, capaz de produzir progesterona para manter a gestação. Sendo assim, a receptora deve receber um embrião com 7 a 8 dias de idade, compatível com o ambiente uterino, para aumentar a sua chance de sobrevivência.

FIGURA3- Exemplo de protocolo hormonal adotado na IATF e na TETF.



OBS. Nesse esquema, a TETF seria realizada no Dia 17, na presença de um corpo lúteo.

O objetivo da TETF é aumentar o aproveitamento das receptoras (Marques et al., 2004; Baruselli et al., 2006). Na TETF, a quantidade de receptoras pode ser reduzida, não é necessária a observação de cio, o que diminui o manejo e a mão de obra, possibilitando também a programação das datas de realização da transferência. Em contrapartida ocorre elevação do custo da técnica, devido aos gastos com protocolos hormonais (Bó et al., 2006).

2.6.5 Sexagem espermática e adoção de sêmen sexado na TE

A sexagem espermática é uma tecnologia que gera grandes vantagens para o produtor, permitindo a escolha do sexo da prole, de acordo com o foco da propriedade, como por exemplo, produção de fêmeas para reposição das matrizes (TRIGAL et al., 2012), acelerando o avanço genético (RATH; JOHNSON, 2008).

Garner e Seidel Jr (2008) relataram que a FIV é a técnica onde a utilização de sêmen sexado se apresenta com maior vantagem, pois diminui a viabilidade dos espermatozoides, mas na FIV estes ainda podem ser bem aproveitados.

São inúmeros os fatores que influem nos resultados da PIVE, quando se utiliza sêmen sexado, verificando-se baixas taxas de fertilização, clivagem e formação de blastocistos (MERTON et al., 1997).

2.7 Técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é conhecida como a terceira geração de biotecnologias reprodutivas. A técnica, inicialmente era empregada em animais de raças taurinas, o que apresentou grande mudança dos últimos anos, sendo atualmente mais utilizada em animais da raça zebuína (VIANA et al., 2010).

De acordo com Nonato JR et al (2004), no Brasil, a PIVE é a primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e comercial. Em relação a outras biotecnologias, uma vantagem particular da PIVE é o maior aproveitamento do sêmen, possibilitando obter um maior número de embriões ao usar doses de sêmen de alto valor comercial, ou no caso do uso de sêmen sexado.

2.7.1 Seleção de doadoras

Á seleção de doadoras de alto desempenho genético é de suma importância para bom resultado da técnica de transferência de embriões. É importante selecionar animais que não tenham patologias reprodutivas, estejam com bom escore corporal e de preferência, que estejam ciclando (GONÇALVES et al., 2002). Como sugerido por Williams (2001), a doadora que se encontra com menos de sessenta dias de pós-parto não deve ser incluída na transferência.

A avaliação da doadora por meio de ultrassonografia é uma opção para reconhecimento da fase do ciclo estral que ela se encontra e também para avaliar a presença de alguma anomalia reprodutiva (GOUVEIA, 2011).

2.7.2 Estimulação folicular das doadoras

Para que ocorra aumento no desempenho reprodutivo de animais geneticamente melhores, é necessário aumentar o número de ovulações, visto que, de maneira natural, os bovinos conseguem produzir uma cria ao longo do período de um ano. É viável aumentar o número de embriões produzidos e o número de crias produzidas ao longo da vida útil de uma fêmea (AMARAL et. al., 2004).

Por meio da aplicação de gonadotrofinas é possível aumentar a quantidade de ovulações, mecanismo que é conhecido como “superovulação”, demonstrando que em bovinos, a técnica é efetiva quando consegue se obter mais de duas ovulações (CABODEVILA & TORQUATI, 2001).

A superovulação é uma técnica eficaz para aumentar as progênes de fêmeas com genética superior, podendo ser realizada através de aplicação seriada de FSH no começo da segunda onda folicular, isto é, entre os dias 9 e 12 do ciclo estral (GOULDING et al., 1990). A resposta ovariana à superovulação depende do número de folículos presentes no ovário que são sensíveis à gonadotrofina, e da fase da onda folicular no instante em que ocorre a aplicação do FSH. Este é um dos principais problemas dos programas de superovulação, pois é necessário realizar o tratamento hormonal no momento adequado do ciclo estral (BO et al., 2006). O estímulo folicular com eCG pode ser outra alternativa para realizar um protocolo de superovulação, uma vez que esse atua como FSH em fêmeas bovinas.

A realização do estímulo hormonal com FSH se inicia anteriormente à emergência da onda folicular ou no dia do início da mesma, antes dos folículos subordinados entrarem em processo de atresia. Segundo Pierson et al. (1988), Grasso et al. (1989) e Adams (1994), pode-se resultar em uma baixa resposta superovulatória se os tratamentos com gonadotrofinas forem iniciados posteriormente a fase de seleção, na presença de um folículo dominante.

Alguns estudos mostram que a eliminação do folículo dominante, podendo ser de forma hormonal ou física, leva a um aumento da liberação de FSH, favorecendo a emergência de uma nova onda. Para controlar a dinâmica folicular, é possível

também usar ésteres de estradiol associados a progestágenos para sincronizar a onda folicular. O uso da progesterona junto ao estrógeno leva a ocorrência da emergência de uma nova onda folicular em torno de 4 a 5 dias após o tratamento (BO et al.; 2004).

De acordo com BO et al. (2004), a resposta superovulatória é semelhante a iniciada na emergência da segunda onda folicular ou nos dias 8 a 12 do ciclo estral, devendo ser iniciado o tratamento com gonadotrofinas quatro dias depois do tratamento com estradiol e progesterona. O objetivo é sincronizar a emergência da onda folicular, coletando-se os oócitos presentes nos folículos emergentes por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal.

2.7.3 Aspiração folicular guiada por ultrassom

A técnica conhecida como “ovum pick-up” (OPU), foi criada por Pieterse et al. (1988), e se tornou importante para a PIV, visto que previamente os métodos utilizados para a recuperação de oócitos eram muito traumáticos. A aspiração folicular, visando a coleta de oócitos, é realizada por via transvaginal guiada por ultrassom, sendo amplamente realizada em bovinos.

De acordo com Mainardes (2010), o processo de aspiração folicular é efetuado utilizando um ultrassom, com um transdutor microconvexo conectado a uma guia de aspiração, contendo uma agulha conectada em sua extremidade. É necessário aplicar uma pressão de vácuo através de uma bomba de vácuo ajustada entre 60 e 80 mmHg, levando os oócitos até um tubo de 50ml (tubo Falcon). Inicialmente, as doadoras serão colocadas no tronco de contenção, de forma calma para evitar o estresse. É executada a palpação retal para observar as condições dos ovários, e realizada a limpeza da região perineal com sabão e água. A analgesia é feita com anestesia epidural baixa com 5 ml de lidocaína 2%.

A guia de aspiração conectada ao transdutor do ultrassom é guiada até o fórnix vaginal, e com a ajuda da manipulação retal, os ovários são posicionados para obtenção de uma boa imagem na tela do ultrassom. Os folículos são então aspirados, obtendo-se os oócitos. A conservação dos oócitos e a lavagem da agulha são realizados com PBS, acrescentando-se 5,0 UI/ml de Heparina, 50 mg/ml Gentamicina e 1% de soro fetal bovino. O sistema é conectado a um tubo de 50 ml

tipo Falcon. O líquido aspirado passa por esse sistema e é depositado no tubo (MAINARDES, 2010).

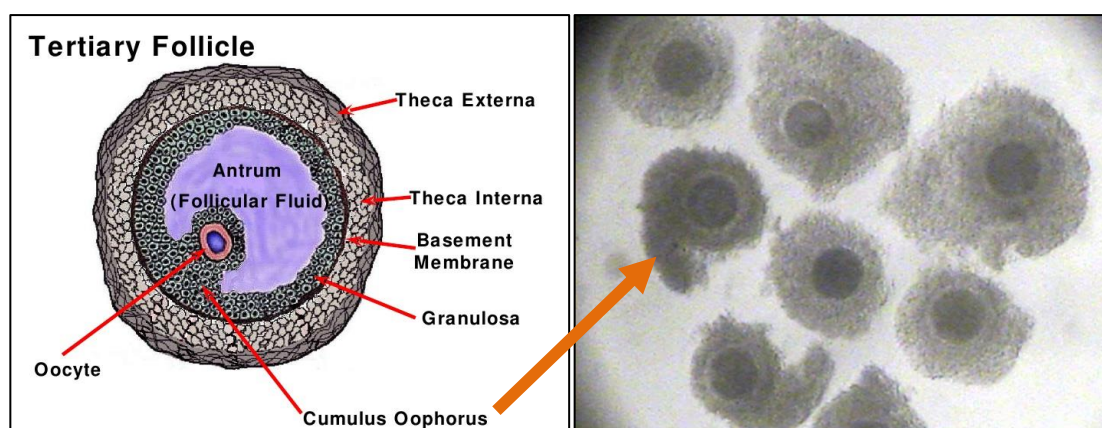
A OPU possui a grande vantagem de ser uma técnica pouco invasiva, podendo ser utilizada em todas as fases do ciclo estral, não sendo necessariamente obrigatória a pré-estimulação hormonal dos folículos. Em relação à TE convencional, pode produzir quatro vezes mais embriões, apesar do custo por embrião ser maior (BOUSQUET et al., 1999).

A técnica pode ser usada em animais jovens a partir de 2 a 3 meses, e também em vacas sênior. Podendo ser executada até duas vezes por semana, não interferindo na condição fisiológica do animal exógena (GALLI et al., 2004), e não precisa de estimulação hormonal, quando adotada em fêmeas de raças que naturalmente produzem maior população de folículos ovarianos.

2.7.5 Qualidade do oócito

O oócito depende diretamente da presença do grupamento de células conhecidas como *cumulus oophorus*, pois são essas células que vão lhe proporcionar nutrição, influenciando no metabolismo e no seu desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2011). Como relatado por Chaves et al. (2010), a presença e a qualidade das células do *cumulus oophorus* é um fator que serve de parâmetro para classificação desse oócito, quando essa se encontra intacta, mostra grande competência oocitária (FIG. 4).

Figura 4- Células do *cumulus oophorus* e oócitos de boa qualidade (graus 1 e 2)



Fonte: Penitente-Filho et al. (2013)

De acordo com sistema de classificação feita por Leibfried e First (1979) os complexos *cúmulos*-oócitos viáveis estão presentes na classificação da qualidade oocitária nos graus 1, 2 e 3, sendo que não se encaixando nessa classificação, os oócitos serão descartados (grau 4), sendo que o Grau 1 indica oócitos com o complexo de células do *cumulus* intacta e compacta e com mais de três camadas de células (FIG. 4). Grau 2: oócitos com menos de três camadas celulares no *cumulus oophorus*. Grau 3: presença das células do *cumulus*, porém de forma expandida. O ooplasma não preenche totalmente o espaço perivitelínico, podendo este estar fragmentado. Grau 4: Oócitos desnudos - ausência de células do *cumulus oophorus*.

2.7.6 Transporte de oócitos

O transporte do *cumulus*-oócitos do campo até o laboratório é um fator de grande importância, podendo causar queda na viabilidade e qualidade do oócito, o que compromete os resultados da PIVE (SILVA et al., 2011). As condições do transporte, como temperatura, pH do meio e o tempo de transporte tem influência direta na capacidade dos oócitos de produzir embriões viáveis (SILVA et al., 2011).

Os oócitos podem ser transportados em tubos de poliestireno ou em criotubos, com em incubadoras com controle da atmosfera gasosa e temperatura. O meio utilizado para o transporte é o de maturação, e geralmente é constituído de TCM-199, bicarbonato e tampões (SILVA et al., 2011).

Caso a atmosfera gasosa não seja equilibrada durante o transporte é essencial a adição de um tampão orgânico para que não ocorra grande variação do pH. A temperatura ideal gira em torno de 38,5°C, que é semelhante às condições *in vivo* (LOIOLA et al., 2014).

Para transporte dos oócitos, uma possibilidade é utilizar o fluido folicular bovinos (FF), aspirado de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro. Os oócitos conservados em fluido folicular passam por uma paralização da meiose, o que facilita a sincronia na maturação citoplasmática e nuclear, porém, existe grande chance de ocorrer contaminação com agentes infecciosos devido a origem biológica do fluido (LEIVAS et al., 2004).

Uma vez no laboratório, os oócitos são novamente avaliados (graus 1 a 4, de forma semelhante à descrita anteriormente), registrando-se todos os achados, para que posteriormente, seja avaliada a eficácia do processo de PIVE. A primeira fase

da PIVE, denominada de maturação *in vitro* (MIV), compreende a etapa de maturação nuclear do oócito. A segunda fase consiste na fecundação *in vitro* (FIV), quando os oócitos são colocados na presença de espermatozoides para ocorrência de fertilização. Caso ocorra a clivagem, os embriões são mantidos em meios de cultivo *in vitro*, sendo esse processo interrompido em torno de sete dias, na fase de blastocisto. As taxas de maturação e fecundação giram em torno de 80%, enquanto a taxa de produção de blastocistos, varia de 35 a 40% (PONTES et al., 2010).

2.7.7 Maturação *in vitro*

A maturação oocitária tem início logo após a aspiração do folículo (WRENZYCKI, 2016). Para se tornar apto a fecundação, é necessário que o oócito passe por algumas modificações, que incluem mudanças nucleares e citoplasmáticas, relacionadas com transformações bioquímicas e estruturais (RENESTO, 2004).

Para produção de embriões *in vitro*, é necessário seguir o mais próximo da condição em que esse oócito teria *in vivo* (KASTERSTEIN et al., 2013). A temperatura deve ser controlada uma vez que o oócito sob temperatura elevada pode sofrer danos no desenvolvimento do citoesqueleto, causando um subdesenvolvimento nuclear e até mesmo apoptose. Tem-se como ideal a temperatura de 39°C, com 5% de CO₂ (MENCHACA et al., 2016).

De acordo com Donnison e Pfeffer (2004), a maioria dos oócitos atingem a maturação nuclear, entretanto, apenas alguns irão conseguir chegar à fase de blastocisto, o que vai diferenciar se o oócito é competente.

Naturalmente, dentro do ciclo estral bovino, o oócito permanece na fase diploide durante o período dentro do folículo. Para sofrer a maturação, quando ocorre o pico pré-ovulatório de LH, é necessário que esse seja capaz, através da meiose, de evoluir para metáfase II. A conclusão da maturação vai acontecer no momento pré-ovulatório, sendo que posteriormente irá acontecer a fertilização (STROEBECH et al., 2015).

In vitro, a maturação nuclear se inicia com a ativação do oócito, ocorrendo a retomada da meiose, partindo da prófase I desenvolvendo até a metáfase II momento em que irá ocorrer à segunda paralisação, prosseguindo até a fertilização (MOTLIK et al., 1998). *In vivo* o estímulo para o início da maturação é a ação do

pico de LH, antes da ovulação. *In vitro*, a progressão até a meiose não é influenciada pelas gonadotrofinas e se inicia logo após a aspiração folicular do oócito (BILODEAU-GOESEELS, 2011).

A maturação citoplasmática consiste na reorganização das organelas e ocorrência da dinâmica dos filamentos do citoesqueleto (FERREIRA et al., 2009). A mitocôndria, por exemplo, que é responsável fornecimento de energia, migra da periferia do oócito inativo para próximo da região nuclear no oócito ativo (STOJKOVIC et al., 2001).

Alguns elementos são adicionados ao meio para elevar a taxa de maturação oocitária, como, por exemplo, soro fetal bovino, soro de fêmea em estro, hormônios, líquido folicular, fatores de crescimento, co-cultivo de células do *cumulus* e células da granulosa (SANFINS et al., 2004). Normalmente utiliza-se para maturação *in vitro*, 10% de soro e 20% de tensão atmosférica de oxigênio, sendo que o soro de fêmea no cio e o soro fetal bovino fornecem suplementação proteica para o meio (CAMARGO et al., 2006).

Um meio que demonstra grande eficiência é o fluido folicular, onde se tem a combinação de ácidos nucleicos, proteínas, hormônios, metabólitos, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e íons, sendo esses capazes de possibilitar a maturação (CHAVES et al., 2010).

O meio comercial TCM-199 é muito utilizado atualmente para maturação *in vitro*, estimulando a divisão celular e conseqüente melhor desenvolvimento embrionário (VIREQUE et al., 2009).

Sobre uma gota de meio contendo os oócitos em processo de maturação, utiliza-se óleo mineral ou óleo de parafina a fim de evitar que ocorra a evaporação do meio (MENCHACA et al., 2016).

2.7.8 Fertilização *in vitro* (FIV)

Compreende a junção dos gametas femininos e masculinos levando à formação de um zigoto, que continua se desenvolvendo até a fase em que será chamado de blastocisto (MELLO et al., 2016).

Na FIV, para realizar a junção dos gametas é necessário manusear e tornar capacitado o espermatozoide, que será utilizado para posterior fecundação do oócito maduro (KATO e NAGAO, 2015).

A manutenção dos gametas é feita na temperatura de 39°C em uma atmosfera com 5% de CO₂, em umidade saturada. É necessário realizar a separação do plasma seminal, retirar espermatozoides mortos e também os crioprotetores, por meio de uma técnica denominada gradiente de PERCOLL. Espermatozoides viáveis são diluídos na concentração de 1 a 5 x 10⁶ SPTZ/mL, sendo que o tempo de incubação dos oócitos junto aos espermatozoides é de 12 a 20 horas (GONÇALVES et al., 2007).

2.7.9 Cultivo de embriões *in vitro*

O cultivo de embriões *in vitro* (CIV) representa uma das últimas fases da PIVE, utilizam-se meios que sejam bastante semelhantes ao natural, para assim tentar obter um bom resultado (WRENZYCKI, 2016).

Após a fecundação, os zigotos são colocados em microgotas de meio de cultivo, constituídas de fluidos semelhantes ao do útero e das tubas uterinas (ANTONIOLLI, 2005). Para decorrer seu desenvolvimento até a fase de blastocisto, é necessário que o zigoto passe por um cultivo capaz de fornecer ambiente adequado, e é a partir desse momento que irá ocorrer à ativação do genoma (GONÇALVES et al., 2002).

Comumente, os meios utilizados para cultivo de embriões são meios semi-definidos, com baixa tensão de oxigênio, 5% de O₂, contendo pouca quantidade ou nenhum soro (MINGOTI, 2005). A duração do cultivo pode ocorrer até sete dias após a fecundação, data que na qual é realizada a avaliação e seleção dos embriões que serão utilizados para a TE (GONSALVES et al., 2002).

2.7.10 Qualidade de embriões

De acordo com Lonergan et al. (2006) é notável que a qualidade dos embriões produzidos *in vivo* é maior do que os embriões produzidos através da PIVE, o que vai atingir diretamente a taxa de gestação.

Rizos et al. (2002) compararam as etapas de produção *in vitro*, alternando com a maneira *in vivo* de produção, e foi observado que o meio de cultivo após a

fecundação é o agente de maior influência na qualidade embrionária. Oócitos que foram tanto maturados, quanto fecundados *in vivo*, ao serem cultivados *in vitro*

demonstram viabilidade igual aos embriões que passaram por todas as etapas *in vitro*. A taxa de embriões que chega até a fase de blastocisto é inferior a 40%. Comercialmente observam-se taxas de blastocistos em torno de 25 a 35% (NEVES et al., 2010).

2.7.11 Seleção de receptoras

A qualidade da receptora é de grande importância, pois o ambiente uterino é um dos principais fatores responsáveis pela mortalidade embrionária (MCMILLAN, 1998). Segundo Hasler (2001), novilhas utilizadas como receptoras apresentam taxas de gestação melhores quando comparada às pluríparas. O que foi explicado por Berg et al. (2010), demonstrando que o útero nunca gestante apresenta melhor ambiente para o desenvolvimento embrionário, além de apresentar maior facilidade para a manipulação, o que leva a menor liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no momento da transferência do embrião.

Andersen (1991) desenvolveram um padrão para exame do trato reprodutivo de receptoras de TE, no qual o escore 1 é considerado ruim e o 5, ótimo.

Tabela 1 - Descrição dos escores do trato reprodutivo (ETR) de novilhas de acordo com os achados de exames ginecológicos.

ETR	Cornos uterinos	Ovários
1	Imaturo, sem tônus, cornos com menos de 20mm de diâmetro	Ausência de folículos detectáveis
2	Pouco tônus, cornos com 20 a 25mm de diâmetro	Folículos com até 8mm de diâmetro
3	Tônus razoável, cornos com 25 a 30mm de diâmetro	Folículos com 8 a 10mm de diâmetro
4	Tônus bom, cornos com 30mm de diâmetro	Folículos com mais de 10 mm de diâmetro
5	Tônus muito bom, cornos com mais de 30mm de diâmetro	Folículos com mais de 10 mm de diâmetro e presença de corpo lúteo

Fonte: Adaptado de ANDERSEN et al. (1991)

2.7.12 Inovulação do embrião

A inovulação nada mais é que a deposição do embrião nem um dos cornos uterinos da receptora, se atentando para o lado onde está localizado o corpo lúteo. É utilizada uma bainha onde a palheta com o embrião é inserida, a qual é adaptada ao inovulador, protegido por uma camisa sanitária (COSTA, 2005).

Ainda de acordo com Costa (2005), para o manejo, a receptora deve estar devidamente contida, com auxílio de um tronco. Em seguida deve ser realizada anestesia epidural. O reto deve ser limpo previamente, e deve ser dada muita atenção para a higiene da região perineal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi realizado a partir dos dados cedidos por um laboratório comercial de produção de embriões bovinos *in vitro*, localizado na cidade de Oliveira – MG (ANEXO A). De acordo com dados meteorológicos obtidos no Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (<https://www.cptec.inpe.br/mg/oliveira>), a região apresenta temperatura máxima durante o mês de janeiro (30°C) e temperatura mínima nos meses de junho e julho (9,7°C).

Os dados analisados no presente estudo foram referentes às aspirações foliculares e produção *in vitro* de embriões bovinos, tendo sido obtidos no período de janeiro a dezembro de 2017.

3.2 Manejo das vacas doadoras

As doadoras apresentavam padrões raciais distintos, sendo principalmente das raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) Gir e Guzerá. Os oócitos obtidos a partir de aspirações foliculares desses animais eram destinados à produção *in vitro* de embriões meio-sangue Holandês x Zebu.

Para seleção das doadoras foi preconizado que se encontrassem com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (em uma escala de 1 a 5).

Não foram informadas a categoria (novilha ou vaca), idade e ordem de parto das doadoras aspiradas. O manejo nutricional desses animais também não foi informado, visto que as doadoras eram provenientes de propriedades distintas, localizadas na região de Oliveira-MG, e em outras regiões de Minas Gerais.

As fêmeas eram aspiradas periodicamente por médicos veterinários especialistas em reprodução animal. Na maioria das vezes, não foram adotados protocolos hormonais para estimulação folicular. Somente quando ocorria diminuição da população folicular, eram adotados protocolos de estimulação previamente à realização das aspirações foliculares.

3.3 Aspiração folicular, classificação e transporte dos oócitos imaturos

As aspirações foram realizadas com auxílio de ultrassonografia, utilizando-se um transdutor intravaginal específico, sendo as punções foliculares feitas com auxílio de agulhas hipodérmicas conectadas por uma mangueira de silicone ao tubo de coleta, com auxílio de uma bomba de vácuo, gerando a pressão negativa. O meio de coleta era constituído por tampão salina fosfatado (PBS) e mantido na temperatura de 35°C.

Posteriormente, o conteúdo coletado foi lavado em filtros para colheita de embriões, sendo depositados em placas de Petri. Com auxílio de um estereomicroscópio, os oócitos recuperados foram lavados em gotas de meio TCM-199, tamponado com HEPES, suplementado com soro fetal bovino (SRB), piruvato de sódio e amicacina.

A avaliação dos oócitos foi feita a partir das características do citoplasma, de acordo com sua homogeneidade, presença de grânulos e/ou vacúolos, morfologia citoplasmática, além de serem avaliadas a presença e o número de camadas de células do *cumulus oophorus* (LEITE et al., 2017).

Para o transporte dos oócitos, das fazendas até o laboratório, foram utilizados criotubos contendo meio de maturação *in vitro*, tendo como base o meio TCM-199, suplementado com SFB, FSH, hCG e estradiol, piruvato de sódio e amicacina.

3.4 Produção *in vitro* de embriões

Na etapa de maturação *in vitro*, os oócitos permaneceram por 24 horas em uma estufa incubadora, na temperatura de 38,5°C, com atmosfera controlada - 5% de CO₂, 95% de umidade - em meio TCM-199, contendo bicarbonato, 10% de SFB, 0,5 mg/ml de FSH, 5g/ml de LH, 10mg/ml de estradiol, 22mg/ml de piruvato de sódio e 83,4mg/ml de amicacina.

Para a realização da fertilização *in vitro*, foram utilizadas doses de sêmen de touros da raça Holandesa, sexado para fêmea. Os touros eram escolhidos previamente pelos proprietários, e tinham comprovação de fertilidade na produção *in vitro*. O sêmen foi descongelado em água na temperatura de 35°C durante 30 segundos, sendo a seleção dos espermatozoides viáveis feita pela técnica de gradiente de Percoll. O conteúdo resultante da centrifugação foi lavado em meio de

capacitação espermática, obtendo concentração de $0,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL (XU et al., 2006). Para a fertilização, a incubação dos oócitos com os espermatozoides foi feita durante 18 a 22 horas, em meios semelhantes ao de maturação. Foi utilizado o meio constituído por FERT-TALP (PARRISH et al., 1995), acrescentando amicacina (83,4 mg/ml), penicilina (27mg/ml), hipotaurina (1mg/ml), epinefrina (0,3mg/ml), albumina sérica bovina (5mg/mL), piruvato (22mg/mL) e heparina (10mg/mL).

Os zigotos obtidos na etapa de FIV foram cultivados no meio *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF), adicionando de 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 2,5% de soro fetal bovino (SFB), mantido em incubadora temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ e 5% de O₂, umidade máxima.

O dia da fertilização é considerado como D0. Para avaliar a taxa de clivagem foram analisados embriões no D2, e no D7 observou-se a taxa de produção de blastocistos, ou seja, a taxa de produção de embriões.

3.5 Transporte dos embriões

Parte dos embriões foram transportados do laboratório para as fazendas a partir do estágio de mórula. O transporte de parte dos embriões foi feito em meio em criotubos contendo meio de cultivo (M-CIV), coberto com óleo mineral, previamente gaseificados com a mistura de gases (5%CO₂, 5%O₂ e 90% de N₂).

Quando os embriões eram transportados no estágio de blastocisto, eles foram envasados individualmente, em palhetas contendo meio de transferência de embrião (M-TE). O tempo de transporte variou de acordo com a localização da fazenda.

Previamente ao envio para o campo, os embriões eram avaliados em relação à qualidade, sendo enviados somente embriões considerados viáveis.

3.6 Manejo das receptoras

Os critérios para seleção das receptoras englobaram a avaliação da presença de corpo lúteo, ausência de fluidos intrauterinos e condição do trato reprodutivo. O protocolo hormonal para sincronização das receptoras consistia em três manejos:

- Dia 0: Implantes intravaginais progesterona + Aplicação de benzoato de estradiol, via IM

- Dia 8: Retirada do implante de progesterona + Aplicação de PGF2 α , cipionato de estradiol e eCG, via IM.

- Dia 17: Transferência dos embriões.

Os embriões foram transferidos nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto propriamente dito ou blastocisto expandido.

Quando o número de receptoras era inferior ao número de embriões enviados a campo para transferência, estes eram descartados.

3.7 Análises estatísticas

Os dados cedidos pelo laboratório, referentes aos oócitos obtidos nas aspirações foliculares, e os dados referentes à produção *in vitro* de embriões coletados a partir de aspirações realizadas no período de janeiro a dezembro de 2017, foram previamente separados, considerando a época do ano, sendo:

- Verão: dados coletados de 21 de dezembro a 21 de março;
- Outono: dados coletados de 22 de março a 21 de junho;
- Inverno: dados coletados de 22 de junho a 20 de setembro;
- Primavera: dados coletados de 21 de setembro a 20 de dezembro.

Os mesmos dados também foram separados de acordo com o médico veterinário que realizou as coletas (técnicos 1, 2 e 3).

Para realização das análises estatísticas, quando os dados numéricos não apresentaram distribuição normal, eles foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo considerada a mediana para caracterizar a presença de diferenças significativas ou não, nas tabelas de resultados.

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística por meio do programa GraphPad InStat versão 3.0.10.0, considerando-se o nível de significância igual a 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram realizadas 1.296 procedimentos de aspiração folicular guiada por ultrassom no período de janeiro a dezembro de 2017, tendo sido aspirados 15.858 oócitos, que resultaram na produção de 3.779 embriões.

O número médio de oócitos viáveis por doadora, a partir de análises realizadas a campo, foi semelhante em todas as épocas do ano ($P > 0,05$), conforme apresentado na Tabela 1. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de oócitos viáveis por doadora, a partir de avaliações realizadas no laboratório (TAB. 2). A diferença das avaliações de viabilidade dos oócitos realizadas pelos veterinários a campo, em relação às análises feitas pelos técnicos do laboratório, foi de 14%. Para cálculo das taxas obtidas a seguir, foram considerados o número de oócitos viáveis no laboratório.

Tabela 1 - Número total de oócitos viáveis observados a campo e média de oócitos viáveis por doadora, de acordo com a época do ano

	Nº de doadoras	Oócitos viáveis a campo	Oócitos viáveis a campo / doadora
Verão	231	3053	13,2
Outono	252	3252	12,9
Inverno	361	4264	11,8
Primavera	452	5289	11,7
Médias	324	3964	12,4

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: Não houve diferença significativa do número de oócitos viáveis observados a campo em relação à época do ano (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,786$).

Tabela 2 - Número de oócitos viáveis observados no laboratório de acordo com a época do ano

	Nº de doadoras	Oócitos viáveis no laboratório	Oócitos viáveis no laboratório / doadora
Verão	231	2677	11,6
Outono	252	2813	11,2
Inverno	361	3595	10,0
Primavera	452	4600	10,2
Médias	324	3421	10,7

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: Não houve diferença significativa do número de oócitos viáveis por doadora observados no laboratório de acordo com a época do ano (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,789$).

Corroborando com o presente estudo, Dayan (2001), encontrou resultados semelhantes, comparando o número de oócitos viáveis obtidos por doadoras de raças zebuínas, ao longo das estações do ano. No verão ($10,57 \pm 2,87$ oócitos),

outono ($9,77 \pm 3,08$ oócitos), e no inverno ($11,51 \pm 2,36$ oócitos), primavera ($10,60 \pm 3,15$ oócitos), as médias de oócitos obtidos por doadora foram semelhantes. Fatores como temperatura e fotoperíodo também não influenciaram na produção de oócitos no estudo de Junior (2013), que obteve médias semelhantes ao estudo atual, no verão ($11,26 \pm 6,94$) e no inverno ($13,40 \pm 10,08$).

Após a fecundação, as células do zigoto passam por um processo denominado clivagem, que consiste nas primeiras divisões celulares. Na tabela 3 estão apresentadas a quantidade de oócitos clivados e a taxa de clivagem, onde podemos observar que na primavera a taxa de clivagem foi inferior (60,6%), quando comparada às demais estações do ano ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Taxa de clivagem de acordo com a época do ano

	Oócitos clivados	Taxa de clivagem (%)
Verão	1968	73,5
Outono	2173	77,2
Inverno	2706	75,3
Primavera	2786	60,6
Médias	2.408	70,2%

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: A taxa de clivagem obtida na primavera foi significativamente menor que nas outras épocas do ano (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,015$).

Um dos principais fatores que afeta a taxa de fecundação é a incompetência do oócito em realizar a maturação, o que inviabiliza o desenvolvimento embrionário. Zeron et al. (2001) relatam que o estresse térmico pode afetar as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares, sendo verificadas diferenças na morfologia de oócitos obtidos durante o período mais frio do ano, quando comparados ao período mais quente, em relação à qualidade dos oócitos.

Em Minas Gerais, de forma semelhante ao verão, a época de primavera costuma ser quente e chuvosa. Entretanto, neste estudo, no verão, a taxa de clivagem foi superior à média obtida na primavera, e semelhante às obtidas no outono e no inverno (TAB. 3).

A quantidade de embriões produzidos por doadora não sofreu interferência de fatores como temperatura e fotoperíodo, obtendo-se médias semelhantes independentemente da época do ano (TAB. 4).

Tabela 4 – Total de embriões produzidos *in vitro* e média de embriões por doadora de acordo com a época do ano

	Total de embriões produzidos	Média de embriões por doadora
Verão	742	3,2
Outono	692	2,7
Inverno	968	2,7
Primavera	1376	3,0
Médias	944	2,9

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: Não houve diferença significativa da média de embriões produzidos *in vitro* por doadora de acordo com a época do ano (teste Kruskal-Wallis P = 0,816).

Sobre o efeito das condições climáticas nos resultados na PIVE, esta pode ser relacionada com a temperatura ambiente e com a disponibilidade de alimentos em determinada época do ano (FERREIRA et al., 2014). São vários os autores que relatam os efeitos dos estímulos ambientais na função reprodutiva de fêmeas *Bos indicus*, demonstrando que ocorre aumento nos níveis de séricos de LH, FSH e progesterona nas épocas quentes e chuvosas, quando há maior disponibilidade de pastagens, e redução do diâmetro de folículos e CL em épocas com restrição alimentar, como é observado nas estações mais frias, nos sistemas de produção extensivos, nos quais as vacas são mantidas a pasto (RHODES et al., 1995).

A pequena quantidade de embriões produzidos por doadora em todas as épocas do ano pode estar relacionada com a utilização do sêmen sexado na PIVE. Sabidamente, o sêmen sexado apresenta baixa fertilidade (MAXWELL et al., 2004). A menor fertilidade do sêmen sexado, pode ser explicada devido a maior exposição do espermatozoide a lesões durante o processo de sexagem, e ao grande número de agentes causadores de estresse como centrifugação, exposição a corantes de DNA, alta pressão, luz laser e carga elétrica (MAXWELL et al., 2004).

Segundo Lima (2012) a sazonalidade influencia diretamente na qualidade dos oócitos e dos embriões de animais que apresentam hipertermia. Por outro lado, é necessário considerar diferenças entre taurinos e zebuínos em relação ao conforto térmico. De acordo com Pereira (2005) a zona de conforto térmico para animais *Bos indicus* é de mínima de 10°C e máxima de 27°C. Para vacas Holandesas, pode ser considerada uma diferença de 6°C a menos (PERISSINOTO; MOURA, 2009).

Devido a diferenças de adaptação, considera-se que zebuínos sejam mais resistentes ao calor, podendo não sofrer efeitos semelhantes ao taurinos nas estações mais quentes do ano (Hansen, 2004). Ao pesquisar a interferência da

sazonalidade em vacas Gir, Dourado et al. (2012) relataram que a quantidade de embriões produzidos *in vivo* não foi alterada por fatores climáticos, e, inclusive a quantidade de oócitos fecundados foi maior no verão. Esses autores relatam que fêmeas zebuínas podem ser mais resistentes aos efeitos do estresse calórico.

Em um estudo feito por Rocha et al. (1998), com intuito de avaliar doadoras *Bos taurus* e *Bos indicus* a partir da realização da OPU, durante o verão e inverno, observou-se que as fêmeas *Bos taurus* apresentaram taxa inferior de oócitos normais no verão, onde nenhum embrião chegou ao estágio de blastocisto, porém para doadoras *Bos indicus*, não foi observado diferença na porcentagem de oócitos ou no desenvolvimento embrionário entre as estações do ano.

As quantidades de embriões enviados a campo e de embriões desprezados, podem ser observadas nas tabelas 5 e 6, onde é demonstrado não haver diferença significativa entre as épocas do ano ($P > 0,05$).

Tabela 5 – Embriões enviados a campo de acordo com a época do ano

	Embriões enviados a campo	Embriões enviados por produzidos (%)
Verão	622	83,8
Outono	626	90,5
Inverno	928	95,6
Primavera	1024	74,4
Médias	800	84,7%

Fonte: Aatoria Própria, 2019.

Nota: Não houve diferença no número de embriões enviados a campo de acordo com a época do ano (teste Kruskal-Wallis $P = 0,768$).

Tabela 6 - Embriões desprezados de acordo com a época do ano

	Embriões desprezados	Embriões desprezados por produzidos (%)
Verão	147	19,8
Outono	154	22,3
Inverno	183	18,9
Primavera	380	27,6
Médias	216	22,2%

Fonte: Aatoria Própria, 2019.

Nota: Não houve diferença do número de embriões desprezados de acordo com a época do ano (teste Kruskal-Wallis $P = 0,768$).

A quantidade de embriões produzidos foi superior ao número de receptoras disponíveis, situação relatada por muitos médicos veterinários nos dias de hoje (comunicações pessoais). Essa situação requer atenção especial por parte dos produtores e veterinários, devido ao alto custo de produção dos embriões. Loyola et

al. (2014), relataram descarte de parte dos embriões produzidos devido à falta de receptoras. Do total de embriões produzidos (2.767), 518 foram descartados.

Devido à menor taxa de clivagem obtida na primavera no estudo atual, era esperado que nessa estação houvesse redução na taxa de produção de embriões, o que não ocorreu conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Taxa de produção de embriões de acordo com a época do ano

	Oócitos viáveis no laboratório	Embriões produzidos (%)
Verão	2677	27,7
Outono	2813	24,6
Inverno	3595	26,9
Primavera	4600	29,9
Médias	3421	27,6%

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: A taxa de produção de embriões não demonstrou diferença significativa em relação à época do ano (teste Kruskal-Wallis P = 0,458).

A maior resistência de raças zebuínas a elevadas temperaturas se atribui a maior competência de regular a temperatura corporal, o que não se apresenta tão eficiente raças taurinas (HANSEN, 2004).

Ao comparar vacas das raças Gir e Holandesa mantidas em condições climáticas tropicais, Vianna et al. (2007), verificaram diferenças significativas em relação às taxas de clivagem (66,7% vs. 53,1% para as raças Gir e Holandesa, respectivamente), e taxa de embriões produzidos (19,6% vs. 10,8% de blastocistos para as raças Gir e Holandesa, respectivamente), sugerindo que oócitos de vacas Gir obtidos em condições tropicais possuem maior potencial em desenvolver *in vitro* até estágio de blastocistos, comparados aos da raça Holandesa.

O fato de animais zebuínos apresentarem maior resistência a altas temperaturas justifica o fato de serem mais competentes no desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto (PAULA-LOPES et al., 2003).

No presente estudo, a baixa taxa de embriões produzidos em todas as épocas do ano, pode ser atribuída ao fato de se ter utilizado sêmen sexado na PIVE. Spegiorin (2010) comparou as taxas de produção de embriões produzidos com sêmen sexado e convencional, e observou que, com sêmen sexado a taxa de produção de embriões viáveis foi inferior (28,2%) à taxa de produção obtida a partir de sêmen convencional (34,9%). Inclusive a taxa de produção de embriões produzidos com sêmen sexado foi semelhante à obtida no presente estudo.

Na literatura, são escassos os estudos que avaliam o efeito do técnico responsável pela coleta dos oócitos, nos resultados da PIVE. Neste estudo, as 131 aspirações foliculares foram realizadas por sete Médicos Veterinários, sendo que três deles realizaram 93% dos procedimentos (TAB. 8). Interessantemente, observou-se diferença nas quantidades coletadas de oócitos viáveis por doadora, observados a campo (TAB. 9) e no laboratório (TAB. 10), verificando-se que o técnico 3 teve desempenho significativamente superior aos técnicos 1 e 2 ($P < 0,05$).

Tabela 8 - Número total de oócitos viáveis observados a campo e média de oócitos viáveis por doadora de acordo com o médico veterinário.

	Nº de aspirações	Nº de doadoras
Técnico 1	80	742
Técnico 2	25	311
Técnico 3	17	150
Outros	9	93
Total	131	324

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Tabela 9 - Número de oócitos viáveis a campo por doadora de acordo com o médico veterinário

	Oócitos viáveis a campo	Oócitos viáveis a campo por doadora
Técnico 1	8172	11,0
Técnico 2	3322	10,7
Técnico 3	2874	19,2
Outros	1490	16,0
Média	3964	14,2

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: O número de oócitos viáveis a campo por doadora de acordo com Médico Veterinário demonstrou significativa diferença (teste Kruskal-Wallis $P = 0,001$).

Tabela 10 - Número de oócitos viáveis no laboratório por doadora de acordo com o médico veterinário

	Oócitos viáveis laboratório	Oócitos viáveis laboratório por doadora
Técnico 1	6984	9,4
Técnico 2	2756	8,9
Técnico 3	2620	17,5
Outros	1325	14,2
Média	3421	12,5

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: O número de oócitos viáveis no laboratório por doadora de acordo com o Médico Veterinário apresentou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,0002$).

Além de apresentar interferência do técnico na quantidade de oócitos aspirados, a taxa de clivagem também diferiu de acordo com o Médico Veterinário, porém, nessa comparação, deve se levar em consideração o fato de “outros técnicos” terem sido considerados mais eficientes que os técnicos 1, 2 e 3 (TAB. 11).

Tabela 11 – Taxa de clivagem de acordo com o médico veterinário

	Oócitos clivados	Taxa de clivagem (%)
Técnico 1	4863	69,60
Técnico 2	1793	65,10
Técnico 3	1856	70,80
Outros	1121	84,60
Média	2408	70,4%

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Nota: A taxa de clivagem de acordo com o Médico Veterinário apresentou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis, **P = 0,0008**).

As médias de embriões produzidos por doadora de acordo com o Médico Veterinário não diferiram, apesar de ter ocorrido uma tendência do Técnico 3 ser superior aos demais ($P < 0,10$).

Tabela 12 - Total de embriões produzidos in vitro por doadora de acordo com o médico veterinário

	Total de embriões produzidos	Média de embriões por doadora
Técnico 1	1905	2,6
Técnico 2	967	3,1
Técnico 3	611	4,1
Outros	296	3,2
Média	944	3,2

Fonte: Autoria Própria, 2019.

O número embriões produzidos por doadora de acordo com o Médico Veterinário não apresentou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis $P = 0,0720$).

Ao analisar as quantidades de embriões enviadas a campo (TAB. 13), o técnico 2 teve um desempenho significativamente inferior aos demais ($P < 0,05$). Esse resultado reflete a qualidade dos embriões produzidos de acordo com o médico veterinário. No caso do técnico 3, aproximadamente 97% dos embriões produzidos foram enviados a campo (quantidade de embriões enviados para transferência / quantidade de embriões produzidos no laboratório). Interessantemente, as médias de oócitos considerados viáveis/doadora, obtidas por esse técnico, tanto nas avaliações de qualidade dos oócitos realizadas a campo, como no laboratório, foram superiores aos demais (TABs 9 e 10).

Tabela 13 - Embriões enviados a campo de acordo com o médico veterinário.

	Embriões enviados a campo	Embriões enviados por produzidos (%)
Técnico 1	1689	88,7
Técnico 2	639	66,1
Técnico 3	595	97,4
Outros	277	93,6
Média	800	84,7

Fonte: Autoria Própria, 2019.

O número de embriões enviados a campo de acordo com o Médico Veterinário apresentou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,0130$).

Sobre a quantidade de embriões desprezados, isto é não transferidos para o útero de receptoras, não foi observada diferença entre os veterinários ($P > 0,05$), contudo, ressalta-se que o técnico 2 descartou o dobro de embriões quando comparado ao técnico 3 (TAB 14). Essa alta taxa de destarte de embriões pode estar relacionada com a maior taxa de produção de embriões obtida pelo técnico 2 ($P < 0,05$), quando comparado aos demais (TAB. 15). Apesar de ter produzido mais embriões, quando observamos a Tabela 13, a terça parte deles foram considerados de baixa qualidade (TAB. 13).

Tabela 14 - Embriões desprezados de acordo com o médico veterinário.

	Embriões desprezados	Embriões desprezados por produzidos (%)
Técnico 1	388	20,4
Técnico 2	316	32,7
Técnico 3	92	15,1
Outros	68	23,1
Média	216	22,8

Fonte: Autoria Própria, 2019.

O número de embriões desprezados de acordo com o Médico Veterinário não apresentou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,4561$).

Tabela 15 - Taxa de produção de embriões de acordo com o médico veterinário

	Oócitos viáveis no laboratório	Embriões produzidos (%)
Técnico 1	6984	27,3
Técnico 2	2756	35,1
Técnico 3	2620	23,3
Outros	1325	22,3
Média	3421	27,6

Fonte: Autoria Própria, 2019.

A quantidade de embriões produzidos de acordo com o Médico Veterinário demonstrou diferença significativa (teste Kruskal-Wallis, $P = 0,0376$).

Constata-se, portanto, que a eficiência do Médico Veterinário influenciou consideravelmente nos resultados da PIVE, no presente estudo. Em outras biotecnias reprodutivas, é comum avaliar a influência do técnico, porém, parte-se do pressuposto que na PIVE, a eficiência do Médico Veterinário não é considerada um dos fatores que influênciam diretamente nos resultados obtidos.

Em programas de IA e IATF, é visto que o inseminador possui papel importante na eficiência da técnica. Falhas na realização dos procedimentos são apontadas como um dos principais fatores que comprometem os resultados de prenhez (Russi et al., 2009). Fernandes (2002) pesquisou a influência dos inseminadores nos resultados de prenhez durante a primeira IA, e observou efeito da habilidade do inseminador, da realização ou não de cursos de inseminação, e, inclusive da reciclagem, nas taxas de prenhez.

Costa e Silva et al. (2005) relatou diferenças nas taxas de prenhez em manejos de IATF, ao comparar os inseminadores. O inseminador que apresentou resultados inferiores era o que realizava a técnica em menor tempo, mostrando que na reprodução, a rapidez na execução dos procedimentos nem sempre está associada à maior habilidade do técnico.

Em um estudo que avaliou a taxa de prenhez de vacas submetidas a protocolos de IATF, Nogueira et al (2011) observaram diferenças significativas na taxa de prenhez, comparando dois técnicos, sendo que o primeiro apresentou taxa de 49%, e o segundo, 38%.

5 CONCLUSÕES

Embora não se possa afirmar que as doadoras de oócitos do presente estudo estiveram, pelo menos durante parte do ano, sob condições de estresse calórico, os resultados obtidos indicam que não houve interferência de fatores climáticos nos resultados na quantidade e viabilidade dos oócitos aspirados e dos embriões produzidos, independentemente da época do ano. De acordo com a literatura, vacas zebuínas, como é o caso da raça Gir, apresentam certa resistência em relação aos efeitos das temperatura elevadas. Dos dados avaliados, somente a taxa de clivagem dos oócitos sofreu variação de acordo com a época do ano, verificando-se que na primavera, os resultados foram inferiores.

Por outro lado, houve influência significativa do Médico Veterinário responsável pelas aspirações no número de oócitos viáveis por doadora, na taxa de clivagem, e, na taxa produção de embriões. No geral, a eficiência do Médico Veterinário não é considerada um dos fatores que influenciam diretamente nos resultados da PIVE, porém, essa realidade deve ser reavaliada e estudada, merecendo maior importância por parte dos pesquisadores.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS GP. **Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle implications for synchronization & super stimulation.** *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.

ALVAREZ, RAFAEL E SALAS, N. **ATUALIDADES SOBRE O USO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA PECUÁRIA DE CORTE NO BRASIL.** *Pesquisa e Tecnologia*, v. 13 n.2, 2016.

ALVAREZ, R.A. **Descrição sucinta das pesquisas com reprodução de ruminantes realizadas pelo Instituto de Zootecnia/APTA.** *B. Industr. Anim.*, v.66, p.73-81, 2009.

AMARAL, J.B.; OBA, E.; PIRES, R.M.L. **Prenhez em bovinos após transferência de embriões bipartidos e de hemi-embriões cultivados in vitro.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita, Anais... Barra Bonita: Acta Scientiae Veterinariae, 2004. v.32, p.194.

ANDERSEN, K.J. et al. **The use of reproductive tract scoring in beef heifers.** *Agric. practice*, v.12, n.4, p.19-26, 1991.

ANTONIOLLI, C.B. **Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária.** *Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre*, 2005.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira.** São Paulo: AgraFNP, 2015. 407p.

ARAUJO P M. S.; VOLPATO R.; LOPES M. D. **Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado.** *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP.* São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 3 (2013), p. 08–15, 2013.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R.; **Ciclo Ovariano. Reprodução em bovinos.** 3ª Ed. São Paulo: Roca, 2006b. Capítulo 4. p. 38-52.

BARUSELLI, P. S. et al. **Situação atual, desafios e perspectivas da reprodução programada em bovinos de corte e de leite.** *Biotechnologia da Reprodução em Bovinos, anais do 7º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.* LondrinaPR, 2016.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS C.M. et al. **Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle.** *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006.

BERG, D.K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P.L. **Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy.** *Theriogenology*, v. 73, p. 250-260, 2010.

BILODEAU-GOESEELS, S. **The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes.** *Molecular Reproduction and Development.* v. 78, p. 734-743, 2011.

BINELLI, M.; IBIAPINA B.T.; BISINOTTO R. S. 2006 **Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, Sup. 1, p. 1-7, 2006.

Becher, AP Neto, W de Oliveira, M Falci, JPJ Mota. **Fatores que afetam a produção in vitro de embriões (PIVE) em bovinos.** *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.28; p.5 5 4 2018.

BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S. **Medicamentos Empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões.** In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.* 5.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Capítulo 28. p. 329-344.

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

BÓ, G.A.; PICINATO, D.; PERES, L.; CUTAIA, L.; NASSER, L.F.; BARUSELLI, P.S. **Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento 1), p. 17-23, 2006.

BÓ, G.A; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S; REIS, E.L. **Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino.** *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v.32, p.1-22, 2004.

BOUSQUET D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. **In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach.** *Theriogenology*, v.51, p.59-70, 1999.

CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. **Superovulação de Fêmeas bovinas.** In: PALMA, G.A *Biotechnologia de la reproducción* 1ª edição INTA, Argentina, 2001. p. 79-108.

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

- CARVALHEIRA, L.R. et al. **10 regras para obter uma detecção de cio eficiente.** Revista Técnica da Bovinocultura de Leite, Piracicaba, SP. v.87/10, p.40–45, jun. 2016.
- CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J.R. **Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.34, p.37-49, 2010.
- COSTA, P. V. F da. **Transferência de embriões usando a IATF.** Centro Regional Universitário, Espírito Santo do Pinhal. São Paulo. p. 84-99, 2005.
- COSTA e SILVA, E. V.; RUSSI, L. S.; RUEDA, P. M.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; DIAS, F. C. F.; PASSOS, T. S.; STUPP, W. Interação homem animal e a fertilidade nos programas de inseminação artificial em tempo fixo de bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBRA, 2005. CD-ROM.
- DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. Controle do Desenvolvimento Gonadal e dos Gametas. In: KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia Veterinária (Cunningham).** 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. Capítulo 35. 408-415.
- DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*.** Botucatu, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. **Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development.** Biol. Reprod.,v.71,p 1813-1821,2004.
- Dourado AP, Torres Filho RA, Cardoso EC, Sinedino LD, Gerhardt BT, Goulard IL, Nogueira LAG. **Produção estacional de embriões in vivo em vacas da raça Gir (Bos indicus) na região sudeste (clima tropical), Brasil.** Rev Bras Vet, v.19, p.183-189, 2012.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Gado do Leite – Importância Econômica.** 2016.
- EMBRAPA. **Nelore: Base genética e evolução seletiva no Brasil.** Planaltina: Embrapa, 2002. P. 50.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle.** Campo Grande, 1991.
- FERNANDES JÚNIOR, A. **Inseminação artificial em gado de corte: impacto da equipe de inseminadores nos resultados obtidos.** 2002. 82f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FERNANDES, C.A.C; Viana, J.H.M. **Efeito do escore corporal sobre a taxa de gestação de receptoras de embrião**. XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Anais..., Belo Horizonte, MG, 1995.

FERRAZ S.B.J. **Análise genética da habilidade de permanência em fêmeas da raça nelore**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.32, n.3, p. 1-8, 2003.

FERREIRA MBD, Lopes BC, Souza JC, Pinto TLC, Lima MR, Lemos FO, Fernandes LO, Garcia JM. **Produção *in vitro* de embriões e prenhez de doadoras da raça Gir (*Bos Taurus indicus*): influência da idade da vaca e do touro**. Anim Reprod, v.11, p.273, 2014.

FERREIRA, E. M. VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. **Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence**. Theriogenology. v. 71, p. 836-848, 2009.

FONSECA et al. **Pregnancy rates of recipient heifers submitted to administration of rbST, GnRH or hCG on day five of the estrous cycle**. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., v.53, n.4, p.459-464, 2001.

GALLI C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al. **Production and quality of bovine oocytes and embryos**. Vet Res Commun 2004;28(Suppl 1):121–6.

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

GODOI, C.R., SILVA, E.F.P. e PAULA, A.P. **Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte**. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 14, Ed. 119, Art. 807, 2010.

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

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

GORDON, I. R. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. ed. London: CABI Publishing, p. 548, 2003.

GOULDING, D., WILLIAMS, D. H., DUFFY, P., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. (1990) **Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle**. Theriogenology, 34:767-778.

GOUVEIA, F.F. **A produção in vitro de embriões bovinos**. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília. 2011.

GRASSO, F.; GUILBAULT, L. A.; ROY, G. L.; LUSSIER, J. G. **Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle**. *Theriogenology*, New York, v. 31, n. 6, p. 1209-1219, 1989.

GRUNERT, E. Sistema Genital Feminino. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger/ Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Capítulo 10. p.269-309.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. In: JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. **Indução da ovulação, produção e transferência de embriões**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p.409-434.

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri, SP: Manole, 2004. Capítulo 11. p. 159-167.

HANSEN, P.J. **Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress**. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.349-360, 2004.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Pesquisa da Pecuária Municipal** 2017.

ÍNDICE TERAPÊUTICO VETERINÁRIO: ITV. 5. Ed. Petrópolis: RJ: EPUB, 2015. 712 p.

JUNIOR, J.F. **Influência da estação do ano na produção de embriões in vitro de bovino no recôncavo Baiano**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. 2013.

KASTERSTEIN E, Strassburger D, Komarovskiy D, Bern O, Komsky A, Raziel A, et al. **The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study**. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1073–9.

Kato Y, Nagao Y. 2015. **Changes in Sperm Motility and Capacitation Induce Chromosomal Aberration of the Bovine Embryo following Intracytoplasmic Sperm Injection**. *PLoS One* 10(6)

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. **Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro**. *Journal of Animal Science*, v.48, p.76-86, 1979.

LEIVAS F. G.; BRUM D. S.; MEZZALIRA A.; PILLA L. F. C.; BERNARDI M. L.; RUBIN M. I. B.; SILVA C. A. M. **Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa**. *Ciência Rural*, v.34, p. 219-224, 2004.

LEITE. A. C, ANDRADE V.B., SILVA E. B. M, BORGES A. M. **Efeito da adição do ácido linoleico conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1 Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação.** Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, MG *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, n.6, p.1385-1392, 2017.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. **Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.35, p.472-482, 2011.

LIMA RS. **O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa.** 2012. Botucatu: 138p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), UNESP, Botucatu-SP, 2012.

LOIOLA M. V. G.; CHALHOUB M.; RODRIGUES A. S.; FERRAZ P. A.; BITTENCOURT R F.; RIBEIRO FILHO A. L. **Validação de um Programa de Produção In Vitro de Embriões Bovinos com Transporte de Oócitos e de Embriões por Longas Distâncias.** *Cienc. anim. bras.*, v.15, p. 93-101, 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. **Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos.** *Theriogenology*, v. 65, p. 137-152, 2006.

LÓPEZ-GATIUS, F. **Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain.** *Theriogenology*, v. 60, n. 1, p. 89–99, 2003.

MACMILLAN KL, Burke CR. **Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency.** *Anim Reprod Sci*, v.42, p.307-320, 1996.

MAINARDES GA. 2010. **Aspiração folicular, produção in vitro e manipulação de embriões bovinos.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tuituti do Paraná Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde

MAGALHÃES, D. M. et al. **Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.36, p.32-38, 2012.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; MELLO, J.E.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. **Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore lactantes.** 2004.

McMILLAN, W. H. **Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer.** *Theriogenology*, v. 50, p. 1053–1070, 1998.

MAXWELL, W. M. C. et al. **Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox.** *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 82-83, n. 2004, p. 79–95, July 2004.

MELLO, R. R. C., Ferreira, J. E., Silva, A. P. T. B. & Mello, M. R. B. 2013. **Desenvolvimento folicular inicial em bovinos.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37, 328-333.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H.B. **Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos**. Rev. Bras. **Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MERTON, J. S.; HARING, R. M.; STAP, J.; HOEBE, R. A.; ATEN, J. A. **Effect of flow cytometrically sorted frozen/thawed semen on success rates of *in vitro* bovine embryo production**. Theriogenology, v. 47, p. 295, 1997.

MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. **Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats**. Anim. Reprod. v.13, p.273-278, 2016.

MORAES, J.C.F., SOUZA, C.S.F., GO/NÇALVES, P.B.D., **Controle do estro e da ovulação em Bovinos e Ovinos**. In: GONÇALVES, P.B.D.,2002.

MORAES, J. C. F. et al. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2014. Capítulo 3. p. 33-56.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.3, p.223-230, Jul./Sept. 2012.

NEBEL, Ray L. **The key to a successful reproductive management program**. Adv Dairy Technol, v. 15, p. 1-16, 2003.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI**. Revista Brasileira de Zootecnia. V39. P.418, Brasília-DF, 2010.

NOGUEIRA, G. de P. **Farmacologia do Eixo Hipotálamo-Hipófise**. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 5.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Capítulo 29. p. 345-362.

NOGUEIRA, E; SILVA, A. S; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. **Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 6 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 97).

NONATO JUNIOR, I. et al. ERENO JÚNIOR, JC; SENEDA, MM. **Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE**. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, v. 18, p. 95, 2004.

NÚÑEZ-OLIVEIRA, R. et al. **Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle**. Animal Reproduction **Science**. v. 146, p. 111-116, May, 2014.

PARRISH, J.J.; KROGRNAES, A.; SUSKOPARRISH, J.L. **Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of “in vitro” fertilization and early embryonic development.** *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.

PAULA-Lopes FF, Chase Jr CC, Al-Katanani YM, Krininger III CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. **Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures.** *Reproduction*, v.125, p.285-294, 2003.

PERISSINOTTO, M.; Moura, D. J.; Cruz V. F.; Souza, S. R. L.; Lima, K. A. O.; Mendes, A. S. **Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy.** *Ciência Rural*, v.39, p.1492-1498, 2009.

PEREIRA, C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.

PIETERSE MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. **Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries.** *Theriogenology* 1988; 30:751–762.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. **Follicular populations during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle.** *Journal of Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 81-95, 1988.

PONTES, J.H.F.; STERZA, F.A.M.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M.. **Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors.** *Theriogenology*, v.75, p.1640-1646, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026.

PRESTES, N. C.; ALVARENGA, F. C. L. **Fecundação e clivagem.** In: ALVARENGA, F. C. L. *Obstetrícia Veterinária*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 1 – 19, 2006.

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

RENESTO, A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular Guiada por Ultra-Sonografia e Superovulação na Produção in vitro e in vivo de Embriões Bovinos.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Medicina Veterinária, Reprodução Animal, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Jaboticabal, 59f. 2004.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; De'ATH, G. **Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus.** *Journal Reproduction Fertility*, v. 104, n. 1, p. 41-49, 1995.

RIBEIRO, L.V.P; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B.; SEKO, M.B.; MARTINEZ, A.C.; RIBEIRO, M.G.; MARTINS, R.R.; ÁVILA, M.R.; DE CONTI, J.B. **Recuperação de ovócitos e produção in vitro de embriões de vacas estimuladas com FSH e eCG.** *Arquivos de Zootecnia*, v.60, n.232, p. 1021-1029, 2011.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. **Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 234-248, 2002.

ROCHE, J. F. **Control and regulation of folliculogenesis** – a symposium in perspective. *Rev. Reprod.*, v. 1, p. 19-27, 1996.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. **High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows.** *Theriogenology*, v. 49, n. 3, p. 657- 665, 1998.

RODRIGUES, C.F.M. Heatwatch. **Gertec embriões.** Jun. 2003. Disponível em: . Acesso em 25 fevereiro. 2019.

ROSSETTO, R., Lima, I.M.T, Saraiva, M.V.A., Verde, I.B.L., Sales. E.T., Figueiredo. J.R. **Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais.** *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

RUSSI, L.S.; Costa e Silva, E.V.; Zúccari, C.E.S. **Importância da capacitação de recursos humanos em programas de inseminação artificial.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.33, p. 20-25, 2009.

SÁ FILHO, M. F. de. **Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte.** 2012. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANFINS A, PLANCHA CE, OVERSTROM EW, ALBERTINI DF. **Meiotic spindle morphogenesis in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality.** *Hum Reprod*, v.19, p. 2889 - 2899, 2004.

SALLES et al. **Transferência de embrião em vacas da raça Simental na Região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 35, n.4, p. 1 – 8, 1998.

- SARTORI, R. **Manejo reprodutivo da fêmea leiteira.** Reprodução Animal, v. 31, n. Xvii, p. 153–159, 2007.
- SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition.** 2.ed. Washington: Current Conceptions, 2003. 314p
- SEVERO, N.C. **História da inseminação artificial no Brasil.** Rev. Bras. Reprod. 39, 17-21, 2015.
- SILVA L. K.; REIS A. N.; SILVA A. O. A.; SOUSA J. S.; SOUZA A. J. O.; VALE W. G. **Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, p.74-80, 2011.
- SIQUEIRA, L.S. Leal, E. Oba. **Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina.** Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.139-148, jul./set. 2009.
- SOUZA, A. H. et al. **Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows.** Theriogenology, v.72, p.10-21, 2009.
- SPEGIORIN, M. R. **Efeito da base genética, raça da doadora e do tipo de sêmen Na produção *in vitro* embriões bovinos.** Belo Horizonte. Mestrado. Escola de Veterinária – UFMG. 2010
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. **Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture.** Biology of Reproduction. v. 64, p. 904-909, 2001.
- STROEBECH, L; MAZZONI, G; PEDERSEN, H. S; FREUDE, K. K; KADARMIDEEN, H.N; CALLESEN, H; HYTTEL, P. ***In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology.** *Anais*, 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, 2015,p. 148-156.
- TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J. N.; MUÑOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DIEZ, C. ***In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryo *in vitro* produced with sex-sorted sperm.** Theriogenology, v. 78, p. 1465-1475, 2012.
- Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. **Formation of mammalian oocyte and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.** Theriogenology. 63: pg 1717-1751.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. **Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil.** REUNIÃO ANUAL

DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), Porto de Galinhas, PE, 2010. P.325-334.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L. S. A, SÁ, W. F, FERREIRA, A. M., FREITAS, C. **Desenvolvimento de embriões produzidos in vitro da raça gir e holandesa criadas em clima**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2007

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA e SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. **Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Baxgenes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules**. *Theriogenology*, v. 71, p. 620-627. 2009.

WILLIAMS, G. L. **Implicações de amamentação e manejo de cria na eficiência reprodutiva futura de vacas de corte**. In: V CURSO NOVOS ENFOQUES NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2001. Uberlândia, 2001. p 65.

WRENZYCKI, C. **Sistemas de cultivo in vitro: quão longe estamos das condições ideais**, 2016., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, p. 155-159

Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. **Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles**. *Reproduction*, v.121, p.447-454, 2001.

ANEXO A



Centro Universitário de Formiga - UNIFOR/MG
Avenida Doutor Arnaldo de Senna, 328, Bairro Água Vermelha
CEP 35570-000 Formiga/MG

TERMO DE SOLICITAÇÃO DE DADOS

À Doutoranda Ana Carolina Leite,

Eu, Dra. Telma da Mata Martins, brasileira, professora do Centro Universitário de Formiga, UNIFOR/MG, sirvo-me do presente para solicitar a Vossa Senhoria, dados referentes à "coleta de óocitos por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom e produção in vitro de embriões bovinos", obtidos em um dos laboratórios comerciais de PIVE, para os quais você prestou assistência durante o ano de 2017. Pretendemos utilizar esses dados na execução do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Isabela de Carvalho Simões, que está regularmente matriculada no nono período do curso de Medicina Veterinária do UNIFOR/MG. O tema do seu trabalho será relacionado com "fatores que interferem na produção in vitro de embriões bovinos". Os dados serão analisados pela aluna, sob a minha supervisão, e, posteriormente, serão utilizados para fins acadêmicos, atendendo as normas internas da referida instituição para Trabalhos de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária. Gostaria de ressaltar que caso você julgue necessário, a identificação do laboratório será preservada.

Formiga, 25 de março de 2019

Solicitante:

Profa Dra Telma da Mata Martins

Orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Isabela de Carvalho Simões
- UNIFOR/MG.

De acordo com a concessão dos dados:

Doutoranda Ana Carolina Leite

Assistente técnica e prestadora de serviços para laboratórios comerciais de produção
in vitro de embriões bovinos