

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TESE**

**Análise Multivariada de Características Reprodutivas em  
Fêmeas e Avaliação da Produção *in Vitro* de Embriões na  
Raça Sindi (*Bos indicus*)**

**Raquel Rodrigues Costa Mello**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ANÁLISE MULTIVARIADA DE CARACTERÍSTICAS  
REPRODUTIVAS EM FÊMEAS E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN  
VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI (*Bos indicus*)**

**RAQUEL RODRIGUES COSTA MELLO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Marco Roberto Bourg de Mello**

*e Co-orientação da Professora*  
**Sabrina Luzia Gregio de Sousa**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência Animal** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ  
Janeiro de 2016

636.291

M527a

T

Mello, Raquel Rodrigues Costa, 1984-

Análise multivariada de características reprodutivas em fêmeas e avaliação da produção in vitro de embriões na raça Sindi (*Bos indicus*) / Raquel Rodrigues Costa Mello. - 2016.

80 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Inclui bibliografias.

1. Zebu - Teses. 2. Zebu - Reprodução - Teses. 3. Fertilização in vitro - Teses. 4. Análise multivariada - Teses. 5. Reprodução animal - Teses. I. Mello, Marco Roberto Bourg de, 1971- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus...*

*Aos meus queridos pais João Batista da Costa Mello e Maria Rodrigues Costa Mello...*

*Ao meu querido irmão Daniel Rodrigues Costa Mello...*

*Ao meu querido amor Luiz Otávio Cais Gentile...*

*A minha eterna princesa Shine...*

*Aos meus orientadores Marco Roberto Bourg de Mello e Sabrina Luzia Gregio de Souza...*

*A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro...*

*A todos os meus Amigos...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha Família, pela força e pelo apoio em todos os momentos de minha carreira.

Ao meu companheiro e amigo Luiz Otávio Cais Gentile, pelo carinho, amor, paciência e apoio em todos os meus estudos e projetos pessoais e profissionais.

Ao professor orientador Marco Roberto Bourg de Mello, por toda a confiança e parceria para a realização e conclusão deste trabalho com a raça Sindi.

A professora co-orientadora Sabrina Luzia Gregio de Sousa, por sua ajuda e orientação na interpretação das análises estatísticas e genéticas deste trabalho.

Ao professor Helcimar Barbosa Palhano, pela colaboração, parceria e ajuda nos artigos científicos e nas experiências profissionais.

As colegas de trabalho Letícia Del-Penho Sinedino e Ana Carolina Vieira de Miranda, pela imensa ajuda nas análises estatísticas.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter me proporcionado esses longos e belos anos de experiência, aprendizagem e conhecimento.

A Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) e a Fazenda Reunidas Castilho, por terem gentilmente contribuído com o banco de dados para este estudo com a raça Sindi.

A Universidade da Flórida (UFL/Flórida/EUA) e ao professor José Eduardo Portela Santos, por terem me acolhido e me proporcionado a incrível possibilidade e concretização de superar barreiras e limites, além do imenso aprendizado alcançado.

Aos professores do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Vera Lúcia Teixeira de Jesus, José Eugênio Três e Júlio César Ferraz Jacob, pelo apoio e por me incentivarem sempre a buscar novos conhecimentos e explorar novos ambientes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por me acompanharem ao longo de toda essa jornada e pelas inúmeras possibilidades alcançadas.

A todos os parceiros de equipe, estagiários, alunos, funcionários e amigos do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela amizade, parceria e todos os desafios superados.

Aos grupos de oração da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (GOU e GPP), que foram fundamentais para o meu crescimento pessoal, espiritual e profissional.

A todos os meus amigos, em especial à Soraia John, Edson Soares, Marília Gabriela Tirelli, Kenedy Mota, Cristiane Roppa, Thiago Costa, Áurea Lúcia, Diana Costa, Sandra Fernandes, Doniésia Isabel, Clériston Andrade, Irineu Pedro, Camila Camilo, Cássia Marques, Cristina Saraiva, Vânia Aparecida Militão, Rafaella Olivieri, Aline Matos Arrais, Ana Paula Toledo, Beatriz de Oliveira Cardoso, Michele Santos, Fabíola Anne, Isabela Pereira, Bruna Rodrigues e Adriana Marçal, pela imensa e maravilhosa amizade e confiança.

## BIOGRAFIA

RAQUEL RODRIGUES COSTA MELLO, filha de João Batista da Costa Mello e Maria Rodrigues Costa Mello, nasceu em 01 de fevereiro de 1984 na cidade de Cataguases, estado de Minas Gerais. cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Astolfo Dutra, em Cataguases, Minas Gerais, entre o período de 1995 e 1998, e o ensino médio na Escola Estadual Manuel Inácio Peixoto, em Cataguases, Minas Gerais, entre o período de 1999 e 2001.

Ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em abril de 2004, concluindo o mesmo curso em julho de 2009.

Ingressou no Programa de Estágio no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2007, onde foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPERJ entre o período de 2008 e 2009, sob a orientação do professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello.

Ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZ), nível Mestrado, na área de concentração em Produção Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello e co-orientação do professor Doutor Helcimar Barbosa Palhano (IB/DAA/UFRRJ), em 2009, tendo obtido o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2011 com a defesa da Dissertação intitulada “Parâmetros Reprodutivos de Vacas Sindi (*Bos taurus indicus*) Tratadas com Dois Protocolos de Sincronização da Ovulação”, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de 2010 a 2011.

Ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZ), nível Doutorado, na área de concentração em Produção Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello e co-orientação da professora Doutora Sabrina Luzia Grégio de Sousa (IZ/DPA/UFRRJ), em 2012, tendo obtido a declaração parcial para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia em 2016 com a defesa da Tese intitulada “Análise Multivariada de Características Reprodutivas em Fêmeas e Avaliação da Produção *in vitro* de Embriões na Raça Sindi (*Bos indicus*)”, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de 2013 a 2016.

Participou do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) financiado pela CAPES, onde foi bolsista como participante e integrante de Projetos de Pesquisa na área de Reprodução, Nutrição, Sanidade e Metabolismo de Bovinos de Leite desenvolvidos pelo “Animal Science Department”, “Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS)” e “Dairy Research Unit (DRU)” da Universidade da Flórida (UF), localizada em Gainesville, Flórida, EUA, sob a orientação do professor Doutor José Eduardo Portela Santos (Research Foundation Professor), entre o período de outubro de 2014 a agosto de 2015.

Durante os Cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado, participou de Projetos de Pesquisa e Publicações nas áreas de Fisiologia Reprodutiva e Biotécnicas de Manejo Reprodutivo em Bovinos, com ênfase na Raça Zebuína Sindi, assim como Cursos e Eventos Científicos e Técnicos realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e em outras Instituições.

*“Se vocês ficam unidos a mim e minhas palavras permanecem em vocês, peçam o que quiserem e será concedido a vocês. A glória de meu Pai se manifesta quando vocês dão frutos e se tornam meus discípulos. Assim como meu Pai me amou, eu também ameï vocês, portanto, permaneçam no meu Amor. Se vocês obedecem aos meus mandamentos, permanecerão no meu Amor, assim como eu obedeci aos mandamentos do meu Pai e permaneço no seu Amor. Eu digo isso a vocês para que minha Alegria esteja em vocês, e a Alegria de vocês seja completa (...)*

*O meu mandamento é este: Amai-vos uns aos outros, assim como eu ameï vocês. Não existe Amor maior do que dar a vida pelos amigos. Vocês serão os meus Amigos se fizerem o que eu estou pedindo. Eu já não chamo vocês de empregados, pois o empregado não sabe o que o seu patrão faz; eu chamo vocês de Amigos, porque eu comuniquei a vocês tudo o que eu ouvi de meu Pai. Não foram vocês que me escolheram, mas fui eu que escolhi vocês. Eu os destinei para ir e dar fruto, e para que o fruto de vocês permaneça. O Pai dará a vocês qualquer coisa que vocês pedirem em meu nome. O que eu peço é isto: Amai-vos uns aos outros assim como eu vos ameï!!! (...)*

*(João, 15, 7-17)*

*“Amados, amemo-nos uns aos outros, pois o Amor vem de Deus. E todo aquele que ama, nasceu de Deus e conhece a Deus. Quem não ama, não conhece a Deus, porque Deus é Amor. Nisto se tornou visível o Amor de Deus entre nós: Deus enviou o seu Filho único a este mundo, para dar-nos a vida por meio dele. E o Amor consiste no seguinte: não fomos nós que amamos a Deus, mas foi Ele que nos amou, e nos enviou seu Filho como vítima expiatória por nossos pecados (...)*

*Amados, se Deus nos amou a tal ponto, também nós devemos amar-nos uns aos outros. Ninguém jamais viu Deus. Se nos amamos uns aos outros, Deus está conosco, e o seu Amor se realiza completamente entre nós. Nisto reconhecemos que permanecemos com Deus, e Ele conosco: Ele nos deu o seu Espírito. E nós vimos e testemunhamos que o Pai enviou o seu Filho como Salvador do mundo. Quando alguém confessa que Jesus Cristo é o Filho de Deus, Deus permanece com ele, e ele com Deus. E nós reconhecemos o Amor que Deus tem por nós e acreditamos nesse Amor. Deus é Amor: quem permanece no Amor permanece em Deus, e Deus permanece nele!!! (...)*

*(1 João, 4, 7-16)*

## RESUMO GERAL

MELLO, Raquel Rodrigues Costa. **Análise multivariada de características reprodutivas em fêmeas e avaliação da produção *in vitro* de embriões na raça Sindi (*Bos indicus*).** 2016. 71p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Os objetivos deste trabalho foram verificar a possibilidade de formação de diferentes grupos produtivos por meio de técnicas multivariadas e avaliar a produção *in vitro* de embriões na raça Sindi. Para tanto, foram utilizados dados de desempenho fornecidos pela Associação Brasileira dos Criadores de Zebu e dados de produção *in vitro* de embriões fornecidos pela Fazenda Reunidas Castilho. No primeiro capítulo, foram analisadas as características idade ao primeiro parto, intervalo de partos, eficiência reprodutiva, produção de leite e duração da lactação de 560 fêmeas nascidas entre o período de 1987 a 2011, sendo submetidas às análises dos componentes principais e de agrupamento com o auxílio do programa GENES<sup>®</sup>. Pela análise dos componentes principais, foram estimados cinco componentes, dos quais os três primeiros explicaram 90,79% da variação total dos dados, sendo que a ordem das características mais relevantes foi intervalo de partos, duração da lactação, idade ao primeiro parto, produção total de leite e eficiência reprodutiva. Pela análise de agrupamentos, observou-se a formação de doze diferentes grupos, sendo que foi possível observar as características produção total de leite e idade ao primeiro parto como as mais importantes para a variabilidade dos dados. No segundo capítulo, foram analisados os parâmetros PIV de embriões de acordo com a idade da doadora, estação do ano e tipo de sêmen obtidos de 434 sessões de OPU realizadas em 150 fêmeas. Os dados foram analisados por ANOVA com o programa SAS<sup>®</sup>. Portanto, diante de todos os dados avaliados, o presente estudo permitiu concluir que as técnicas multivariadas foram eficientes para resumir as informações avaliadas e discriminar as características mais importantes, sendo úteis para o direcionamento em programas de melhoramento genético animal cujo enfoque seja maior produção de leite e precocidade reprodutiva, e com relação à avaliação da produção *in vitro* de embriões em fêmeas da raça Sindi, concluiu-se que a doadora e o touro exercem efeito na PIV de embriões, doadoras mais jovens produzem maior número de oócitos recuperados e viáveis por sessão de OPU, doadoras da raça Sindi produzem maior número de oócitos viáveis por sessão de OPU durante a estação chuvosa, não se observando efeito da idade e estação do ano sobre a produção de embriões, e o sêmen não-sexado apresentou os melhores resultados em relação ao sexado na PIV de embriões.

**Palavras-chave:** Bovinos, fertilização *in vitro*, técnicas multivariadas.

## GENERAL ABSTRACT

MELLO, Raquel Rodrigues Costa. **Multivariate analysis of reproductive traits in females and evaluation of *in vitro* production of embryos in Sindhi breed (*Bos indicus*)**. 2016. 71p. Thesis (Doctor Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2016.

The aims of this study were to verify the possibility to generate different productive groups through multivariate techniques and evaluate the *in vitro* production of embryos in Sindhi breed. For this goal, performance data provided by the Brazilian Association of Zebu Breeders and *in vitro* production of embryos data provided by Reunidas Castilho Farm, were used. In the first chapter, the traits age at first calving, calving interval, reproductive efficiency, milk yield and lactation period from 560 females, born in the period from 1987 to 2011, were analyzed, being submitted to principal component and cluster analysis with the aid of GENES<sup>®</sup> program. By the principal components analysis, five components were estimated, in which the first three explained 90.79% of the data total variation, and the order of traits considered most relevant were calving interval, lactation length, age at first calving, total milk yield and reproductive efficiency. By cluster analysis, the formation of twelve different groups were observed, and it was possible to observe total milk yield and age at first calving as the most important traits for total variability of data. In the second chapter, the IVP parameters of embryos according to age of the donor, season of the year and type of semen from 434 OPU sessions held in 150 females were analyzed. Data were analyzed by ANOVA with the SAS<sup>®</sup> program. Therefore, front of all data evaluated, it can be concluded that multivariate procedures were effective to summarize the evaluated information and discriminate the most important traits, and they are useful for targeting in genetic improvement programs whose focus is the increase in milk yield and reproductive precocity, and regarding to evaluation of *in vitro* production of embryos in Sindhi breed females, it can be concluded that donor and sire showed an effect on IVP of embryos, donors with less than 6 years old produce a greater number of recovered and viable oocytes per OPU session, Sindhi donors can undergo OPU with more efficiency during the rainy season, whereas the effect of age and season of the year on production of embryos was not observed, and the unsorted semen showed the best results regarding to sex-sorted one on IVP of embryos.

**Keywords:** Bovine, *in vitro* fertilization, multivariate techniques.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

	Página
<b>Tabela 1.</b> Matriz de correlação entre as variáveis padronizadas utilizadas na análise de componentes principais.....	17
<b>Tabela 2.</b> Componentes principais, autovalores, percentagem da variância explicada pelos componentes e percentagem acumulada da variância explicada pelos componentes .....	18
<b>Tabela 3.</b> Correlações entre as variáveis e os componentes principais (CP) Estimados.....	18
<b>Tabela 4.</b> Grupos de fêmeas da raça Sindi estabelecidos pelo método de otimização de Tocher com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média padronizada.....	21
<b>Tabela 5.</b> Médias das características dos 12 grupos formados pelo agrupamento de Tocher .....	23
<b>Tabela 6.</b> Contribuição relativa das características para a divergência entre 560 fêmeas da raça Sindi pelo método de Singh (1981) .....	25

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Médias de temperaturas mínimas, compensadas e máximas, umidades relativas do ar e precipitações pluviométricas entre os anos de 2008 a 2015 em Novo Horizonte, SP .....	47
<b>Tabela 2.</b> Oócitos recuperados, oócitos viáveis, oócitos degenerados, embriões clivados e blastocistos na raça Sindi. Números total, mínimo, máximo, média e coeficientes de variação.....	49
<b>Tabela 3.</b> Médias de estruturas recuperadas, porcentagem de oócitos viáveis e degenerados, e taxas de clivagem e blastocisto em D7 de acordo com a idade da doadora .....	50
<b>Tabela 4.</b> Médias de estruturas recuperadas, porcentagem de oócitos viáveis e degenerados, e taxas de clivagem e blastocisto em D7 de acordo com a estação do ano .....	52
<b>Tabela 5.</b> Taxas de clivagem e blastocisto em D7 de doadoras da raça Sindi fertilizadas com sêmen não-sexado ou sexado de touros da mesma raça .....	55

## SUMÁRIO

	Página
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>CAPÍTULO I: FORMAÇÃO DE GRUPOS PRODUTIVOS EM FÊMEAS DA RAÇA SINDI POR MEIO DE TÉCNICAS MULTIVARIADAS</b>	
1 INTRODUÇÃO.....	06
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	07
2.1 A Análise Multivariada .....	07
2.2 Técnicas Multivariadas.....	08
2.2.1 Análise de Componentes Principais .....	08
2.2.2 Análise de Agrupamento .....	09
2.3 Aplicação das Técnicas Multivariadas na Produção Animal .....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Local de Coleta dos Dados .....	14
3.2 Características Reprodutivas e Produtivas .....	14
3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística .....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1 Análise de Componentes Principais .....	17
4.2 Análise de Agrupamento .....	21
5 CONCLUSÕES .....	27
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
<b>CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI</b>	
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	38
2.1 Conceito, Origem e Histórico da Produção <i>in vitro</i> de Embriões .....	38
2.2 Etapas da Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	39
2.3 Efeito da Idade da Doadora sobre a Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	41
2.4 Efeito da Sazonalidade sobre a Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	43
2.5 Uso do Sêmen Sexado na Produção <i>in vitro</i> de Embriões .....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Local de Coleta dos Dados .....	46
3.2 Organização do Banco de Dados.....	46
3.3 Animais e Manejo.....	46
3.4 Rotina das Aspirações Foliculares .....	47
3.5 Caracterização Climática da Região em Estudo.....	47
3.6 Parâmetros Avaliados .....	47
3.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1 Produção <i>in vitro</i> de Embriões na Raça Sindí ( <i>Bos indicus</i> ).....	49
4.2 Efeito da Idade da Doadora na Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	50
4.3 Efeito da Sazonalidade na Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	52
4.4 Efeito do Touro e do Tipo de Sêmen na Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	54
4.5 Efeito da Doadora na Produção <i>in vitro</i> de Embriões .....	56
5 CONCLUSÕES .....	58
6 CONCLUSÕES GERAIS .....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## INTRODUÇÃO GERAL

A bovinocultura brasileira é constituída em sua grande maioria por raças zebuínas (*Bos indicus*). A predominância desse grupo genético se deve a maior adaptabilidade às condições climáticas e a disponibilidade de alimentos encontrados no Brasil tropical. Porém, apesar dessas características adaptativas dos zebuínos às condições tropicais, na grande maioria dos rebanhos brasileiros observa-se um comprometimento na eficiência reprodutiva, devido principalmente ao prolongamento do período de anestro pós-parto e a baixa eficiência na detecção de estros. Estes baixos indicadores reprodutivos podem acarretar prejuízos econômicos à atividade pecuária, limitando a implementação de programas de melhoramento genético animal (BARUSELLI et al., 2004).

As raças de origem indiana são de grande importância para a produção de carne e de leite em ambientes de climas tropicais, e algumas vêm se destacando em termos de eficiência e produtividade em diversos países e regiões geográficas (VIEIRA et al., 2010). Entre essas raças, a raça Sindi apresenta aptidão leiteira, eficiência alimentar e alta tolerância ao calor, espalhando-se por várias regiões da Índia e do Paquistão e muitos países da Ásia, África, Oceania e Américas. No Brasil, esta raça possui excelente adaptabilidade às condições adversas de manejo nutricional e clima, principalmente no semiárido da região Nordeste, onde tem sido basicamente explorada para a produção de leite.

A raça Sindi, originária do Paquistão, apresenta porte mediano e pelagem avermelhada, tendo um padrão bem diferenciado em relação às outras raças zebuínas, onde se sobressai sua resistência e maior capacidade de equilíbrio com o meio ambiente. Segundo estimativas da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), o rebanho de Sindi no Brasil ainda é pequeno, sendo computado cerca de 7 mil cabeças (ABCZ, 2014). Apesar de numericamente menor em relação às demais raças, esta tem apresentado alguns índices produtivos e reprodutivos satisfatórios em relação à média nacional, apresentando média de produção de leite de 1850 Kg em 305 dias com persistência de 260 dias e eficiência reprodutiva de 70%. No entanto, a maioria dos rebanhos existentes no Brasil tem apresentado índices aquém dos ideais para a máxima exploração de potencial de produção, tais como intervalo de partos de 17 meses e idade ao primeiro parto de 51 meses (BARROS, 2014).

Apesar da raça Sindi ser considerada de dupla aptidão, a sua aptidão predominante no Brasil é a produção de leite, sendo que esta capacidade tem variado bastante de acordo com a região geográfica, o regime alimentar adotado e principalmente com a maior ou menor intensidade dos trabalhos seletivos a que é submetida. Na região Nordeste, devido à importância da criação destes animais para a pecuária, atualmente tem sido executadas intensos trabalhos pelas instituições de pesquisa, como a Estação Experimental de Alagoinha (EMEPA), situada no estado da Paraíba, que realiza todas as atividades voltadas para o controle leiteiro da raça, cujo o enfoque é o melhoramento genético para a produção de leite. Estas atividades envolvem manejo correto da ordenha, esgotamento dos quartos, pesagem diária do leite produzido com anotações periódicas e análises dos percentuais de gordura e proteína, a fim que se possa ter uma idéia do potencial de cada matriz da raça Sindi em seleção para a maior capacidade de produção de leite em quantidade e qualidade.

Mesmo com os diversas dificuldades que a pecuária brasileira tem passado nos últimos anos, a produtividade do rebanho de algumas raças zebuínas tem aumentado significativamente, e isso tem sido atribuído principalmente à intensa seleção de características produtivas através do aperfeiçoamento de biotécnicas de manejo reprodutivo. Desse modo, biotécnicas como a produção *in vitro* (PIV) de embriões vêm sendo aperfeiçoadas e aplicadas às fêmeas bovinas dos rebanhos brasileiros, fim de se otimizar o seu

potencial reprodutivo e produtivo, e, com isso, obter melhores índices de produtividade e eficiência, a curto e médio prazo. Sabe-se que a produção *in vitro* (PIV), associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* - OPU) é uma excelente ferramenta para a exploração dos rebanhos bovinos, pois viabiliza a utilização de animais bastante jovens, diminuindo o intervalo de gerações e permitindo selecionar matrizes potenciais, levando à produção de novilhas de reposição apenas de animais geneticamente superiores, o que contribui notavelmente para a otimização do melhoramento genético. Adicionalmente, segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), atualmente o Brasil é o país que mais produz embriões bovinos *in vitro* (VARAGO et al., 2008). No entanto, a produção *in vitro* de embriões na raça Sindi ainda é insignificante.

Associado ao progresso das biotécnicas de manejo reprodutivo, as avaliações genéticas têm tido uma demanda crescente, sendo realizada por diversos programas que buscam a melhoria da produtividade, devendo-se, para tanto, determinar quais são os objetivos e critérios mais adequados às necessidades da atividade pecuária. Desse modo, torna-se fundamental conhecer as associações genéticas entre as características de importância econômica, pois em geral são correlacionadas em magnitude e sentido variáveis. Nesse sentido, a utilização das técnicas estatísticas multivariadas é altamente recomendável em virtude das características serem consideradas simultaneamente, podendo gerar interpretações que não seriam possíveis com o uso da estatística univariada (CARDOSO et al., 2003).

A raça zebuína Sindi ainda tem sido pouco avaliada no Brasil quanto aos aspectos reprodutivos e genéticos. Não foram relatados até o presente momento trabalhos que envolvam os procedimentos e resultados da produção *in vitro* (PIV) de embriões e sua posterior eficiência a nível comercial ou até mesmo de pesquisa. Do mesmo modo, não existem estudos referentes às estimativas de parâmetros genéticos, índices de divergência genética e de seleção em fêmeas da raça através de técnicas estatísticas multivariadas, sendo que tais estudos deveriam ser mais estimulados e elucidados, dada a importância da raça para o cenário econômico de algumas regiões do Brasil, principalmente aquelas com poucos recursos alimentares e com rebanhos manejados com um menor nível tecnológico.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica, estado do Rio de Janeiro, tem desenvolvido trabalhos com esta raça desde 2008 por meio da avaliação de fêmeas do próprio rebanho da UFRRJ e de rebanhos experimentais, devido à sua excelente tolerância ao calor e eficiência alimentar. No entanto, poucas pesquisas relacionadas à utilização de biotécnicas como a PIV e às análises multivariadas têm sido conduzidas com a raça. De fato, a aplicação da PIV à referida raça seria uma excelente ferramenta para a obtenção de embriões de fêmeas geneticamente superiores, que poderiam ser identificadas pelas técnicas multivariadas, o que contribuiria para um melhor direcionamento das ações nos programas de melhoramento genético na raça Sindi para a produção de leite.

Desse modo, a importância de se analisar as características de desempenho zootécnico e produção *in vitro* de embriões na raça Sindi está relacionada com a necessidade de se avaliar os critérios para a sua seleção genética, sendo que esta deverá ser funcional e poderá auxiliar os poucos criadores a aumentarem o efetivo e a produtividade dos seus rebanhos. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar informações produtivas e reprodutivas em fêmeas da raça Sindi por meio da análise multivariada, a fim de auxiliar na seleção em programas de melhoramento genético animal e analisar a produção *in vitro* de embriões em fêmeas da raça Sindi em função de alguns fatores, a fim de se verificar seu potencial para esta produção.

## CAPÍTULO I

---

### **FORMAÇÃO DE GRUPOS PRODUTIVOS EM FÊMEAS DA RAÇA SINDI POR MEIO DE TÉCNICAS MULTIVARIADAS**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de formação de diferentes grupos produtivos na raça Sindi por meio de técnicas multivariadas, a fim de se direcionar as ações nos programas de melhoramento genético nesta raça. Para tanto, foram utilizados dados de desempenho fornecidos pela Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) referentes a 560 fêmeas da raça Sindi procedentes de 28 rebanhos dos diferentes estados do Brasil, nascidas entre 1987 a 2011. Desse modo, foram analisadas as características idade ao primeiro parto, intervalo de partos, eficiência reprodutiva, produção de leite e duração da lactação, sendo submetidas às análises dos componentes principais e de agrupamento com o auxílio do programa estatístico GENES<sup>®</sup>. Pela análise dos componentes principais, foram estimados cinco componentes, dos quais os três primeiros explicaram 90,79% da variação total dos dados. O primeiro componente explicou 37,18%, o segundo 33,63% e o terceiro 19,97% da variância total, sendo que esta análise possibilitou a discriminação das características mais importantes e menos importantes para a variação total no conjunto dos dados. As características consideradas mais relevantes para a caracterização do conjunto de dados, em ordem decrescente de importância, foram intervalo de partos, duração da lactação, idade ao primeiro parto, produção total de leite e eficiência reprodutiva. Pela análise de agrupamentos, observou-se a formação de doze diferentes grupos no rebanho Sindi estudado, com uma grande homogeneidade entre os animais para as características avaliadas, com alguns poucos animais formando grupos distintos. Houve a formação de um grupo com 429 fêmeas, ou seja, 76,60% dos genótipos, o que indica que, embora haja genótipos com grande divergência genética entre si, mais da metade é similar para as características avaliadas, evidenciando um grau estreito de relação entre elas. Além disso, foi possível observar as características produção total de leite, com 71,92% da variação total, e idade ao primeiro parto, com 23,06% da variação total, como as mais importantes para a variabilidade dos dados. As características com menor variabilidade e, portanto, consideradas menos importantes foram intervalo de partos, duração da lactação e eficiência reprodutiva, com 4,37; 0,61 e 0,02% da variação total, respectivamente. Assim, evidenciou-se o distanciamento entre os grupos para as diferentes médias de produção total de leite, indicando que tal característica se destaca na diferenciação dos grupos e que tais grupos poderiam ser referenciais para utilização em programas de melhoramento genético, cujo enfoque seja a obtenção de maiores produções de leite. Portanto, conclui-se que os procedimentos multivariados foram eficientes para resumir as informações avaliadas e discriminar as características mais importantes, promovendo maior facilidade na identificação das fêmeas mais adequadas para determinados rebanhos ou sistemas de produção de leite. A análise da contribuição relativa das variáveis foi efetiva na identificação das características produção total de leite e idade ao primeiro parto como mais relevantes para a diferenciação dos grupos formados, sendo úteis para o direcionamento em programas de melhoramento genético cujo enfoque seja maior produção de leite e precocidade sexual.

**Palavras-chave:** Análise de agrupamento, eficiência reprodutiva, produção de leite.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possibility to generate different productive groups in Sindhi breed through multivariate techniques, in order to give directions to genetic improvement programs in this breed. For this goal, performance data provided by the Brazilian Association of Zebu Breeders related to 560 Sindhi breed females from 28 different herds in Brazil, born in the period from 1987 to 2011, were used. The traits age at first calving, calving interval, reproductive efficiency, total milk yield and lactation period were analyzed, being submitted to the principal components and cluster analysis, with the aid of GENES® statistical program. By the principal components analysis, these five components were estimated, and the first three explained 90.79% of the data's total variation. The traits considered most relevant to the discrimination of the data set, in decreasing order of importance, were: calving interval, lactation period, age at first calving, total milk yield, and reproductive efficiency. By cluster analysis, twelve different groups were generated from the pool of Sindhi herds analyzed, with a great homogeneity among females for the traits evaluated, and only few females generating separate groups. Four hundred and twenty-nine females were clustered in one group, representing 76.60% of the genotypes. This indicates that, although there are genotypes with large genetic diversity, more than two thirds of the animals are similar to the traits evaluated, showing a high degree of relationship between them. The traits for total milk yield showed 71.92% of the total variation, and age at first calving contributed with 23.06% of the variation, being the two most important traits for the variability of the data. Thus, there is evidence of divergence between the groups regarding total milk yield, indicating that this trait stands out in the differentiation of groups, and these groups could be benchmarks for the use of genetic improvement programs whose focus is the increase in milk yield. In conclusion, the multivariate procedures were effective to summarize the evaluated information and to discriminate the most important traits, providing better identification of the most appropriate females to certain herds or milk production systems. The analysis of the relative contribution was effective in identifying total milk yield and age at first calving as the most relevant traits for the differentiation of groups, and they can be useful targets for genetic improvement programs that focus on milk yield and reproductive precocity.

**Keywords:** Cluster analysis, milk yield, reproductive efficiency.

# 1 INTRODUÇÃO

A baixa eficiência reprodutiva do rebanho bovino adquire particular importância em regiões de clima tropical, pois nestas regiões a espécie *Bos indicus* representa a maior parte da população bovina, compondo cerca de 200 milhões de cabeças, principalmente da raça Nelore. Neste contexto, a eficiência reprodutiva das fêmeas torna-se primordial, pois cada matriz de produção, seja carne ou leite, deve ser capaz de produzir um bezerro saudável por ano na tentativa de alcançar maior produtividade e competitividade. Desse modo, apesar de ser uma tarefa difícil de ser executada, a eficiência reprodutiva deve ser considerada e inserida nos programas de melhoramento genético animal (AZEVEDO et al., 2006).

O melhoramento genético animal é uma prática que vem sendo utilizada tanto nos países desenvolvidos e nos em desenvolvimento, como o Brasil, e se tornou uma ferramenta útil, que envolve reprodução, biotecnologias e coleta e análise adequada dos dados disponíveis. Segundo Cardoso et al. (2003), as técnicas multivariadas exploratórias ou de sintetização, tais como as análises de componentes principais e de agrupamento, podem auxiliar na formação de grupos de matrizes formadas por animais produtivamente semelhantes e, com isso, maximizar os resultados obtidos com a seleção genética, disponibilizando um conjunto de fêmeas disponíveis para maior produção de leite, maior persistência na lactação e melhores índices de eficiência reprodutiva.

Embora muitos trabalhos venham sendo realizados na área do melhoramento genético animal com diversas raças zebuínas, não há informações sobre a raça Sindi. Ainda existe uma escassez de estudos referentes às avaliações genéticas, tais como a utilização de técnicas multivariadas em estudos relacionados ao desempenho produtivo e reprodutivo na referida raça, sendo importante a realização destas análises quando se almeja desenvolver novas estratégias para melhorar a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos. Associado a isso, o conhecimento do progresso genético alcançado pelos diferentes rebanhos da raça ainda é desconhecido, tanto por criadores que realizam a seleção de maneira empírica, como por aqueles que participam dos programas de melhoramento genético.

As técnicas multivariadas tem grande utilidade em estudos de diversidade ou divergência genética, sendo úteis para a formação de lotes homogêneos de fêmeas, seja para o encaminhamento para rebanhos e sistemas de produção de corte e leite, para vendas ou leilões de animais e até mesmo para facilitar as práticas de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário. Desse modo, essas técnicas auxiliam os diversos programas que buscam obter produtos dos sexos masculino e feminino com desempenhos médios superiores em relação às gerações anteriores por meio da heterose, aumentando a variabilidade da população. Esses conceitos seriam de grande importância para a aplicação em rebanhos da raça Sindi.

A raça Sindi é uma das raças zebuínas que pouco tem sido estudadas no Brasil, sendo indispensável a inserção desta raça nos programas de melhoramento genético animal. Observa-se que ainda há uma falta de conhecimento sobre as possibilidades de identificação e agrupamento de fêmeas desta raça com base na similaridade entre as mesmas. Isto pode estar relacionado ao fato de ainda haver um pequeno número de animais desta raça sobre controle leiteiro no país, associado ao pequeno número de criadores e, conseqüentemente, um menor número de animais nos rebanhos existentes no Brasil. Portanto, o presente capítulo teve como objetivo analisar algumas características reprodutivas e produtivas em fêmeas da raça Sindi, tais como idade ao primeiro parto, intervalo de partos, eficiência reprodutiva, produção de leite e duração da lactação por meio de técnicas de análise multivariada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Análise Multivariada

Os processos multivariados envolvem a avaliação de diversas características, ou variáveis respostas, em todas as unidades experimentais, sendo que a análise multivariada corresponde a um grande número de métodos e técnicas que avaliam simultaneamente as informações de todas as variáveis respostas na interpretação do conjunto de dados, levando em conta as correlações existentes entre elas. A disseminação do uso dessas análises pode melhorar a qualidade das pesquisas, proporcionar uma economia relativa de tempo e custo, e facilitar a interpretação da estrutura dos dados, diminuindo a perda de informação (SARTORIO, 2008; SANTOS, 2009; BIGNARDI, 2010; SAVEGNAGO, 2013).

As técnicas de análise multivariada têm sido aplicadas em diversos estudos científicos nas diversas áreas de pesquisa, com maior ou menor frequência. No entanto, os dados resultantes de pesquisas com temas agropecuários, como nutrição e alimentação animal, fisiologia animal, melhoramento genético animal ou vegetal, produção e tecnologia de alimentos, e produção e qualidade de plantas forrageiras têm sido analisadas por diversas técnicas estatísticas, sendo mais frequente o uso da análise univariada e da análise de regressão linear, múltipla e não-linear. Devido ao fato de se supor a existência de correlação entre essas variáveis, as informações geradas por estas análises podem apresentar resultados incompletos ou pouco informativos (SARTORIO, 2008; SANTOS et al., 2010).

A estatística multivariada é definida como um conjunto de métodos estatísticos utilizados em situações nas quais variáveis são medidas simultaneamente em cada unidade experimental, ou seja, é a área da estatística que tem por objetivo a apresentação, o resumo, a análise e a interpretação dos dados amostrados de populações nas quais para cada unidade experimental são avaliadas diversas variáveis respostas, contínuas ou não. Os métodos de análise dos dados multivariados permitem um estudo global dessas variáveis, levando em consideração as ligações, semelhanças ou diferenças entre elas (SARTORIO, 2008).

As primeiras idéias sobre a análise de dados utilizando-se múltiplas respostas surgiu na década de 1930 com as contribuições de Hotelling (1935) e Fisher (1936), que iniciaram o desenvolvimento de procedimentos analíticos por tratar dessas situações, sendo que somente em 1960 essas técnicas tomaram impulso na França (VICINI & SOUZA, 2003; SARTORIO, 2008). Em geral, as variáveis medidas nas mesmas unidades experimentais estão relacionadas entre si, e quanto maior o número de variáveis, mais complexa torna-se a análise por métodos comuns de estatística univariada. Além disso, desde que as diversas medidas feitas em cada uma das unidades experimentais são correlacionadas, é inadequado aplicar análises univariadas separadamente para cada uma das variáveis, sendo, nesse caso, possíveis de serem realizadas por meio de técnicas de análise multivariada (HAIR Jr. et al., 2009; SARTORIO, 2008; SANTOS et al., 2010; MIRANDA, 2014).

Devido a grande quantidade de cálculos necessários para a realização das análises, sua expansão só foi possível graças ao avanço da tecnologia computacional e ao grande número de softwares estatísticos com módulos de análise multivariada implementados, como, por exemplo, SAS<sup>®</sup>, MINITAB<sup>®</sup>, BMDP<sup>®</sup>, STATISTICA<sup>®</sup>, S-PLUS<sup>®</sup>, R<sup>®</sup>, SYSTAT<sup>®</sup> e GENES<sup>®</sup>. No entanto, alguns desses softwares ainda não são de domínio público (SARTORIO, 2008; SANTOS, 2009; MIRANDA, 2014).

## 2.2 Técnicas Multivariadas

As técnicas multivariadas podem ser classificadas de diversas maneiras, segundo Mingoti (2005). De acordo com este autor, estas podem ser divididas em exploratórias e de inferência estatística. As técnicas exploratórias promovem a simplificação da estrutura de variabilidade dos dados, e quando a distribuição das probabilidades geradoras dos dados amostrais é conhecida, pode-se fazer inferência sobre os dados obtidos. Algumas dessas técnicas são a Análise de Agrupamento (AA), Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Correlação Canônica (ACC), Análise de Correspondência (AC), Análise Discriminante (AD) e Análise Fatorial (AF). Já as técnicas de inferência estatística permitem que conclusões sejam tiradas acerca de uma população usando informações de uma amostra multivariada. Algumas dessas técnicas são a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) e Análise de Regressão Multivariada (MANAREG) (MINGOTI, 2005; SARTORIO, 2008).

Segundo Hair Jr. et al. (2009), é também possível dividir as técnicas multivariadas em técnicas de dependência e interdependência. As técnicas de dependência são aquelas em que uma variável ou conjunto de variáveis é identificado como a variável dependente a ser predita ou explicada por outras variáveis conhecidas como variáveis independentes, por exemplo, MANOVA e AD. Já as técnicas de interdependência são aquelas que nenhuma das variáveis ou grupo de variáveis é definida como independente ou dependente, envolvendo a análise simultânea de todas as variáveis do conjunto de dados, por exemplo, ACP e AF (HAIR Jr., et al., 2009; SARTORIO, 2008; SANTOS et al., 2010).

Em estudos agropecuários e de produção animal, ainda existem poucos trabalhos relatados com o uso das técnicas multivariadas. Nestes estudos, as técnicas mais estudadas são a ACP, AA e AD (SARTORIO, 2008; BIGNARD, 2010). Para título de ilustração e para um melhor entendimento do objetivo deste capítulo, serão descritas brevemente nessa revisão as técnicas multivariadas de análise de componentes principais e análise de agrupamento.

### 2.2.1 Análise de componentes principais

A técnica de componentes principais foi originalmente descrita por Pearson & Hartley (1966) e, posteriormente, aplicada em diversas áreas (SARTORIO, 2008; SANTOS, 2009; BIGNARDI, 2010). Esta análise, de acordo com Morrison (1976), consiste em um método de transformar variáveis correlacionadas em outro grupo de variáveis não correlacionadas, servindo para a obtenção de combinações lineares das variáveis originais com variabilidade relativamente grande, os chamados componentes principais, além de ser uma ferramenta para redução da dimensionalidade dos dados. Segundo Mingoti (2005), o objetivo desta análise é explicar a estrutura das variâncias e covariâncias de um vetor aleatório composto de variáveis aleatórias iniciais, podendo-se resumir sua informação.

De acordo com Cruz (1990), os componentes principais são independentes entre si e são estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo da informação, ou seja, o primeiro componente principal possui a máxima variância, tendo o segundo componente principal a segunda maior variância e, assim, sucessivamente, de forma que toda a informação está contida nos primeiros componentes. Por este motivo, torna-se possível avaliar a importância de cada característica estudada sobre a variação total, possibilitando o descarte de variáveis redundantes, por estarem correlacionadas a outras variáveis, pela sua invariância ou por serem combinação linear de outras características (CRUZ & REGAZZI, 1997; CARDOSO et al., 2003; BARBOSA et al., 2006; BIGNARDI, 2010).

Kirkpatrick & Meyer (2004) relatam que essa técnica é aplicável para qualquer análise que utilize um modelo multicaracterística, onde os efeitos genéticos são correlacionados, sendo, dessa forma, possível estimar os componentes principais genéticos mais relevantes para a variabilidade dos dados. Desse modo, dependendo da magnitude da correlação genética, um pequeno subconjunto de componentes principais geralmente é suficiente para capturar a maior parte da variação genética existente no conjunto dos dados amostrados.

As vantagens dessa técnica são, primeiramente, estimando-se os primeiros componentes principais pode-se produzir um modelo mais econômico, reduzindo o número de parâmetros a serem avaliados. Em segundo lugar, as variâncias tendem a aumentar com o número de parâmetros estimados, sendo que se os componentes principais têm omitido autovalores próximos de zero, erros nas estimativas em decorrência de tal omissão são insignificantes, e podem ser compensados pela redução das variâncias, resultando assim em menor quadrado médio do resíduo em comparação com as análises completas. Em terceiro lugar, as necessidades computacionais são bem menores do que as requeridas para uma análise multicaracterística completa, sendo que isso pode facilitar as análises de grandes conjuntos de dados, produzindo assim estimativas mais precisas dos parâmetros genéticos (MEYER, 2005; BIGNARDI, 2010; SANTOS et al., 2010; SAVEGAGO, 2013).

Esta análise requer que os dados das  $p$  variáveis analisadas sejam métricos. A técnica consiste basicamente em transformar um conjunto original de variáveis ( $Y_1, Y_2, \dots, Y_p$ ) em outro conjunto de dimensão equivalente ( $C_1, C_2, \dots, C_p$ ), tal que:

$$C_j = e_{1j}Y_1 + e_{2j}Y_2 + \dots + e_{pj}Y_p,$$

Em que  $e_{jj'}$  são os coeficientes calculados pela técnica,  $j, j' = 1, 2, \dots, p$ .

Esta técnica pode ser considerada exata, pois em sua composição não se tem a presença do erro, sendo sua estrutura basicamente matemática. Desse modo, esta técnica busca imprimir um tratamento estatístico a um grupo relativamente alto de variáveis heterogêneas, que possuam um grau elevado de correlação entre si. Desta forma, pode-se condensar o conjunto inicial de muitas variáveis ( $Y_i, j = 1, 2, \dots, p$ ) em um número bem menor de novas variáveis ( $C_k, k = 1, 2, \dots, q$ , sendo  $q < p$ ) chamadas componentes principais, conseguindo uma pequena perda de informações (SANTOS, 2009; BIGNARDI, 2010).

Uma vez determinados os componentes principais, os seus valores numéricos, denominados de escores, podem ser calculados para cada elemento amostral. Deste modo, os valores para cada componente podem ser aplicados utilizando-se técnicas estatísticas usuais, como as análises de variância e regressão, sendo esta técnica bastante aplicada na área de melhoramento animal em estudos de divergência genética em bovinos de corte e de leite (MASCIOLI et al., 2000; CARDOSO et al., 2003; BELLO et al., 2008; FERRAZ FILHO, 2008; VAL et al., 2008; SANTOS, 2009; BIGNARDI, 2010; MUNIZ et al., 2014a,b).

### 2.2.2 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento é um conjunto de técnicas utilizadas na identificação de padrões de comportamento em bancos de dados através da formação de grupos homogêneos de dados, sendo também chamada de análise de conglomerados, classificação ou cluster analysis (BARROSO & ARTES, 2003). O objetivo deste tipo de análise é agrupar indivíduos com base em um conjunto de variáveis, maximizando a homogeneidade dentro dos grupos e a heterogeneidade entre grupos (CRUZ & REGAZZI, 1997; HAIR Jr. et al., 2009). Os animais de um programa de melhoramento genético podem ser agrupados com base nos valores genéticos das características avaliadas, sendo difícil estabelecer critérios artificiais para a criação dos grupos. Desse modo, as análises de agrupamento possuem funções que separam

os animais em grupos, com base na semelhança entre as características avaliadas (SANTOS, 2009; SAVEGNAGO, 2013; MIRANDA, 2014).

Existem basicamente dois métodos de análise de agrupamento, sendo a hierárquica e a não-hierárquica (de partição ou otimização). A análise de agrupamento hierárquica agrupa as linhas de um banco de dados (animais, indivíduos e objetos) com base em características de agrupamento. O resultado desta análise é expressa por gráficos denominados dendrogramas, em que os indivíduos são ordenados por proximidade e agrupados segundo as variáveis escolhidas (VAL et al., 2008; HAIR Jr. et al., 2009; SAVEGNAGO, 2013).

O processo da análise de agrupamento envolve duas etapas, sendo que a primeira relaciona-se com a estimação de uma medida de similaridade ou dissimilaridade entre as unidades amostrais, e a segunda com a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos. Entre as medidas de similaridade, uma bastante utilizada é o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o quanto duas características ou variáveis são correlacionadas e interagem entre si, podendo ser entre -1 a +1. Com relação às medidas de dissimilaridade, os registros das características dos indivíduos a serem agrupados são normalmente expressos como medidas de distância, sendo que uma medida de dissimilaridade muito utilizada é a distância Euclidiana. Esta distância é influenciada pela escala de medida das variáveis, pelo número de variáveis e pela correlação existente entre as mesmas (CRUZ & REGAZZI, 1997; ABREU et al., 2002; SAVEGNAGO, 2013; MUNIZ et al., 2014b).

Com relação à adoção de uma técnica de agrupamento, o mais utilizado é o de otimização de Tocher (não-hierárquico). Esta análise utiliza o método do k-médias, e tem o objetivo de aglomerar os indivíduos em grupos previamente estabelecidos, com base na distância Euclidiana, utilizada para medir a distância entre os indivíduos e o par inicial de indivíduos ou centro do grupo, sendo este um vetor de médias das características utilizadas na análise de agrupamento. Geralmente, o número de agrupamentos é pré-estabelecido na análise de agrupamento hierárquica, quando não se tem um critério definido para a criação dos grupos (HARTIGAN, 1975; HARTIGAN & WONG, 1979; HAIR Jr. et al., 2009; SARTORIO, 2008; SANTOS, 2009; SAVEGNAGO, 2013; MIRANDA, 2014).

Desse modo, dado um conjunto de  $n$  indivíduos e  $p$  variáveis, a estimação das medidas de dissimilaridade consiste na conversão da matriz de observações  $n \times p$  em uma matriz quadrada e simétrica de ordem  $n$ , de similaridades ou dissimilaridades individuais, que são medidas da distância entre pares de indivíduos. Na posição  $(i, i')$  dessa matriz, encontra-se a distância entre o  $i$ -ésimo e o  $i'$ -ésimo indivíduo. Desse modo, a distância euclidiana entre os indivíduos  $i$  e  $i'$  ( $d_{ii'}$ ) é dada por:

$$d_{ii'} = \left[ \sum_{j=1}^p (X_{ij} - X_{i'j})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Em que:

$X_{ij}$  = valor obtido para o  $i$ -ésimo indivíduo em relação à  $j$ -ésima variável;

$X_{i'j}$  = valor obtido para o  $i'$ -ésimo indivíduo em relação à  $j$ -ésima variável; e

$p$  = número de variáveis analisadas.

De acordo com Hair Jr. et al. (2009), observações atípicas distorcem o conjunto original dos dados e tornam os agrupamentos obtidos não representativos da verdadeira estrutura da população, sendo que estes autores sugerem como forma mais fácil de conduzir tal projeção a preparação de um diagrama de perfil gráfico. Este diagrama lista as variáveis ao longo do eixo longitudinal e os valores das variáveis ao longo do eixo vertical, sendo que cada

ponto do gráfico representa o valor da variável correspondente, e os pontos são conectados para facilitar a interpretação visual, dando uma idéia da melhor distribuição dos indivíduos.

A análise de agrupamento relaciona-se com outras técnicas multivariadas já conhecidas, podendo ser complementada por estas. Quando se trabalha com um grande número de variáveis, é comum, por exemplo, tentar reduzir a dimensão do conjunto de variáveis por meio da análise de componentes principais, sendo que os escores dos primeiros componentes serão utilizados na análise de agrupamento (MASCIOLI et al., 2000; CARDOSO et al., 2003; SARTORIO, 2008; SANTOS et al., 2010; FREITAS et al., 2011; SAVEGNAGO, 2013; MUNIZ et al., 2014a,b).

### **2.3 Aplicação das Técnicas Multivariadas na Produção Animal**

Existem alguns estudos acerca do uso dessas técnicas na produção animal (SARTORIO, 2008; SANTOS, 2009; BIGNARDI, 2010). Nesse sentido, Meyer (2007) utilizou a análise de componentes principais para estudar 14 características de carcaça em bovinos da raça Angus, e concluiu que, no máximo, oito componentes principais são necessários para modelar a estrutura de covariância genética entre as características avaliadas. Mascioli et al. (2000) aplicaram a análise dos componentes principais em características de crescimento, pesos e ganhos de peso em animais da raça Canchim e concluíram que 75% da variabilidade nas variáveis originais foram retidas nos três primeiros componentes principais, sendo que os pesos à desmama e aos 24 meses e o ganho de peso entre essas duas pesagens obtiveram maior destaque nas análises.

Freitas et al. (2011) avaliaram 283 fêmeas Nelores à desmama, aos 8 meses de idade, e no início da estação de monta, aos 15 meses de idade, por meio da análise dos componentes principais. As características avaliadas aos oito e quinze meses de idade foram peso corporal, escores visuais de conformação de carcaça, de precocidade de terminação e de musculosidade. As características avaliadas somente aos quinze meses foram: tamanho da vulva, tamanho corporal e comprimento do umbigo. Além dessas características, foram analisados o peso e ano de nascimento da mãe, e idade a parição e ao parto das novilhas. Os resultados mostraram que os escores visuais de conformação de carcaça, de precocidade de terminação e de musculosidade podem ser utilizados para auxiliar na seleção e na predição da precocidade sexual de novilhas da raça Nelore aos oito e quinze meses de idade.

Mattar et al. (2008) utilizaram as técnicas de estatística multivariada para a definição de ambientes de produção de bovinos da raça Canchim, por meio de variáveis ambientais, formando grupos homogêneos de municípios do estado de São Paulo com informações de peso ao sobreano desta raça. Neste estudo, as técnicas de agrupamento foram eficientes para a simplificação e formação de quatro grupos homogêneos com membros de municípios do estado de São Paulo e heterogêneos entre si. Já a técnica de componentes principais permitiu discriminar para cada grupo os fatores ambientais mais relevantes em sua formação, através de dois componentes principais, que representaram 81,52% da variabilidade contida no conjunto das variáveis ambientais originais. Desse modo, as técnicas de estatística multivariada foram, neste estudo, ferramentas eficientes para discriminar ambientes de produção em estudos de interação genótipo-ambiente em bovinos da raça Canchim.

Muniz et al. (2004a) estudaram as inter-relações entre pesos e ganhos médios diários, utilizando-se a análise de componentes principais, a partir de 1663 observações de pesos ao nascimento, a desmama ajustado para 230 dias, ao ano ajustado para 365 dias, ao sobreano ajustado para 550 dias e ganho médio diário do nascimento à desmama, da desmama a um ano

de idade e dos 365 dias aos 550 dias de idade de um rebanho de animais cruzados F1. E estudaram também estas mesmas inter-relações a partir de um segundo arquivo com 320 observações das mesmas características de animais puros da raça Nelore. Neste estudo, a maior fonte de variação entre animais foi devida às diferenças em peso, seguida por diferenças nas idades nas quais os animais atingiram maiores pesos. Para o ganho médio diário nas diferentes idades, a variação entre os animais foi principalmente devido às diferentes épocas de nascimento, evidenciando a importância do estabelecimento da estação de monta em sistemas de produção de gado de corte.

Souza et al. (2010) avaliaram as principais características produtivas e suas correlações fenotípicas entre estas como peso ao nascer, peso aos 120, 180, 205, 240, 300, 365, 420, 480 e 540 dias, ganhos de peso do nascimento até os 120 e 205 dias e o peso dos 120 aos 205, dos 205 aos 365 e dos 365 aos 540 dias, e estimaram a influência da idade da vaca em 12440 bezerros da raça Nelore usando técnicas de análise multivariada. Os cinco primeiros componentes principais justificaram 97,08% da variação total, sendo que o primeiro justificou 63,51%, o segundo 12,10% e o terceiro 8,30%, sendo que os outros dois justificaram 13,17%. O maior peso observado aos 240 dias, 194,10 kg, ocorreu em bezerros nascidos de vacas com 108 meses de idade, e o menor peso observado foi de 169,50 kg para bezerros nascidos de vacas com 240 meses de idade. Desse modo, os autores concluíram que o peso aos 240 dias pode ser útil para se fazer uma primeira seleção a essa idade, e que a idade da vaca influenciou neste peso e no ganho médio diário do nascer aos 205 dias, evidenciando a necessidade de ajustes aditivos para a idade da vaca ao parto.

Savegnago (2013) utilizou a análise de agrupamento em animais da raça Holandesa para avaliar a produção de leite em até 305 dias em lactação. Nesse estudo, os valores genéticos da produção de leite a cada 30 dias em lactação foram utilizados como características de agrupamento dos animais da população e, com base neste critério, verificou-se que a população pode ser dividida em três grupos de animais, os quais apresentaram curva dos valores genéticos para a produção de leite acima, na média e abaixo da média. Desse modo, de acordo com o referido autor, as análises de agrupamento possibilitaram explorar o perfil genético da produção de leite dos animais ao longo da curva de lactação, indicando a seleção dos animais baseado na forma da curva genética da característica em vez da seleção baseada em um único valor, sendo úteis para explorar o perfil genético dos animais para a produção de leite, visando identificar os animais mais indicados para a seleção.

Bignard (2010) utilizou as análises de agrupamento para avaliar a produção de leite no dia do controle de vacas da raça Holandesa, a partir de 15.896 controles mensais de 1.820 primeiras lactações, sendo que as análises foram realizadas por meio de modelos ajustando os primeiros dois, três e quatro componentes principais. Neste estudo, os autores concluíram que somente dois componentes principais foram requeridos para modelar a estrutura de covariâncias genéticas entre as produções de leite no dia do controle. Do mesmo modo, Santos et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de propor o método mais adequado, através da análise dos componentes principais, para a separação de três grupos geneticamente divergentes de animais utilizando-se os escores dos componentes principais a partir de dados referentes a produção de leite de animais mestiços Holandês x Gir (1/2 HG, 3/4HG e 7/8HG) durante o período de 2000 a 2006. As características analisadas foram grupo genético (porcentagens de Holandês e Gir), peso do leite produzido no dia do controle e na primeira, segunda e terceira ordenha, idade da vaca ao parto, idade da vaca no dia do controle leiteiro e intervalo de partos. Neste estudo, a análise proporcionou a obtenção de três componentes, com a explicação de 92,84% da variabilidade total dos dados, além de apresentar o melhor

gráfico de separação dos grupos e eliminar o maior número de variáveis redundantes, o que contribuiu para a melhor padronização dos dados.

Os principais trabalhos realizados com as técnicas multivariadas estão voltados para os estudos de diversidade ou divergência genética. Esta pode ser definida como a quantidade total de variações genéticas observadas tanto entre as populações de uma espécie, como entre os indivíduos de uma população, podendo ser inferida por métodos preditos de distância (similaridade e dissimilaridade) genética tomando por base numa série de características que podem ser morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, agronômicas e de polimorfismo de DNA. Recentemente, tem-se estudado a possibilidade de utilização de informações sobre similaridade e dissimilaridade genética por intermédio de Diferenças Esperadas nas Progênes (DEPs), utilizando-se as técnicas de análise multivariada (XAVIER, 2000; FERRAZ FILHO et al., 2006; BELLO et al., 2008; MIRANDA, 2014).

Muniz et al. (2014b) estudaram a a divergência genética entre 73 touros da raça Gir, por meio de medidas de dissimilaridade, métodos de agrupamento e análises gráficas por componentes principais, com base nas DEPs relativas a caracteres ponderais e reprodutivos. Neste estudo, as distâncias Euclidianas médias obtidas foram 4,3743 entre os mais dissimilares e 0,1135 entre os mais similares, sendo que quatro grupos de reprodutores com a mesma similaridade foram obtidos por métodos de agrupamento. Além disso, os três primeiros componentes principais explicaram 82,01% da variância total, sendo que os escores dos componentes principais possibilitaram a avaliação visual da divergência genética, por meio de gráficos de dispersão. Desse modo, os autores concluíram que os resultados encontrados permitiram identificar os animais mais divergentes, recomendando que suas progênes possam ser utilizadas como genitores de acasalamentos em programas de melhoramento genético que visem obter bezerros com melhor desempenho do que os pais.

Val et al. (2008) avaliaram informações de DEPs de 234 touros da raça Nelore participantes de um teste de progênie realizado no período de 1996 a 2003 por meio da análise de agrupamento e componentes principais. As características avaliadas foram peso aos 120 e 210 dias, peso e perímetro escrotal aos 365 e 450 dias e idade ao primeiro parto, sendo que estas foram utilizadas para classificar os animais em três grupos, assim como identificar quais as características possuíram maior poder discriminatório na formação de cada grupo. Os resultados deste estudo evidenciaram que, dos três grupos formados, dois se destacaram quanto aos valores médios das DEPs, sendo que a importância desses dois grupos de touros foi confirmada pela análise de componentes principais, que associou a eles valores superiores de DEPs diretas de peso e perímetro escrotal. Desse modo, estes procedimentos mostraram-se eficientes e constituíram importantes ferramentas para a classificação dos touros, podendo ser usados como auxílio valioso na seleção de reprodutores da raça.

Cardoso et al. (2003) utilizaram a técnica dos componentes principais para analisar dois conjuntos de dados contendo DEPs de nove características pré e pós-desmama de um rebanho da raça Nelore, sendo um conjunto contendo 4740 vacas e outro contendo 158 touros. Segundo estes autores, os três primeiros componentes principais explicaram 76,00% e 71,00% da variabilidade genética contida nos conjuntos de dados originais, respectivamente, para vacas e touros. Quanto ao conjunto de vacas, foi possível detectar alta variabilidade em precocidade sexual e discriminar dois grupos de animais, um contendo alta qualidade genética para características até a desmama e outro contendo alta qualidade genética para características pós-desmama, sendo que também foram encontradas diferenças em precocidade sexual. Quanto ao conjunto dos touros, devido à alta pressão de seleção, foi possível discriminar características à desmama com características ao sobreano, bem como precocidade de terminação, musculosidade e perímetro escrotal.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de Coleta dos Dados

Este trabalho foi realizado a partir da coleta de um banco de dados da ABCZ, que dispõe de animais incluídos no Programa de Melhoramento Genético da Raça Sindi e participantes do controle leiteiro oficial da raça, referentes a rebanhos pertencentes a 28 propriedades localizadas nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Pará. Os dados de eficiência reprodutiva e produção de leite analisados referem-se a 560 fêmeas da raça Sindi (*Bos taurus indicus*), devidamente registradas na Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), localizada em Uberaba, estado de Minas Gerais, nascidas entre o período de 1987 e 2011.

O banco de dados original coletado da ABCZ continha 1880 animais da raça Sindi, incluindo machos e fêmeas. Após a realização da primeira filtragem nos dados, informações de machos e de fêmeas sem genealogia e data de nascimento foram excluídos, restando 1490 fêmeas com a respectiva genealogia completa. Para a realização da segunda filtragem, consideraram-se a produção total de leite e a duração da lactação, restando 790 fêmeas. Para a realização da terceira filtragem, foram consideradas as características idade ao primeiro, intervalo de partos e eficiência reprodutiva, restando 710 fêmeas. Após esta filtragem, foram também excluídos todos os animais que constavam no banco de dados sem nenhuma informação referente às características produtivas e reprodutivas, ou que somente tinham informações produtivas ou reprodutivas. Desse modo, restaram, ao final, 560 fêmeas no banco de dados, com todas as informações produtivas ou reprodutivas completas.

O manejo nutricional e reprodutivo dos animais referentes a este estudo foi específico para cada propriedade e cada região do Brasil. Devido a isso, não houve a possibilidade de mensurar a eminência da sazonalidade pluviométrica e, conseqüentemente, a sazonalidade forrageira e a qualidade das pastagens.

### 3.2 Características Reprodutivas e Produtivas

As características estudadas, com base nas médias de cada animal, foram idade ao primeiro parto (IPP - expressa em dias), intervalo de partos (IDP - expresso em dias), eficiência reprodutiva (ER - expressa em porcentagem), produção total de leite (PTL - expressa em quilogramas) e duração da lactação (DL - expressa em dias). Observações com valores extremos não compatíveis com a realidade fisiológica e com os valores verificados na literatura para a raça Sindi foram excluídas, conforme mencionado anteriormente. Para os cálculos de IPP, IDP e ER, foram consideradas as datas de nascimento e as datas do primeiro e último parto, sendo utilizadas fêmeas com ordem de parto de 1<sup>a</sup> a 17<sup>a</sup>. Animais que apresentaram data de nascimento maior que a data do primeiro ou segundo parto, valores de idade ao primeiro parto inferiores a 400 dias, valores de intervalo de partos inferiores a 330 dias, valores de eficiência reprodutiva superiores a 100% e valores de produção total de leite e duração da lactação negativos foram eliminados do banco de dados, sendo que tal consistência foi alcançada com o auxílio do programa Microsoft Excel 2010<sup>®</sup>.

Desse modo, foram analisadas informações sobre produção de leite e duração da lactação de animais da raça Sindi, sendo que a principal característica estudada foi a produção em até 305 dias de duração, sendo também avaliadas lactações com duração inferior a esta, tal como as encerradas em 205 dias. Do mesmo modo, foram analisadas informações sobre as características reprodutivas de animais da raça Sindi (idade ao primeiro parto, intervalo de

partos e eficiência reprodutiva). Com relação à idade ao primeiro parto, esta foi calculada subtraindo-se a data de nascimento pela data do primeiro parto. Com relação ao intervalo de partos, foram considerados até 16 intervalos, dos quais se calculou o intervalo de partos médio por fêmea zebuína. Com relação à eficiência reprodutiva (ER), adotou-se a fórmula  $ER = \text{número de partos} \times (365 \times 100 / \text{intervalo de partos médio})$ , sendo o intervalo de partos especificado em dias, conforme estudo de Guimarães et al. (2002).

### 3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de análises de componentes principais e de agrupamento, sendo realizados com o auxílio do programa estatístico GENES® (CRUZ, 2006).

Este trabalho foi o primeiro a ser relatado na raça Sindi com o uso de técnicas multivariadas. A metodologia apresentada a seguir foi baseada no estudo de Santos et al. (2010), que adequaram as técnicas para a formação de diferentes grupos produtivos em uma raça explorada para a produção de leite. Desse modo, as técnicas de Santos et al. (2010) e as do presente estudo empregaram a análise de componentes principais e de agrupamento a partir da confecção de uma matriz de correlação entre as variáveis, sendo que os componentes principais selecionados foram os primeiros cuja soma dos autovalores foi capaz de explicar o percentual mínimo de 80,00% da variação acumulada.

Assim, esta técnica consistiu basicamente em transformar um conjunto original de variáveis ( $Y_1, Y_2, \dots, Y_p$ ) em outro conjunto de dimensão equivalente ( $C_1, C_2, \dots, C_p$ ), necessitando, para isso, que os dados das  $p$  variáveis analisadas fossem métricos, tal que:

$$C_j = e_{1j}Y_1 + e_{2j}Y_2 + \dots + e_{pj}Y_p,$$

Em que:

$e_{jj'}$  são os coeficientes calculados pela técnica,  $j, j' = 1, 2, \dots, p$ .

Desta forma, pôde-se condensar o conjunto inicial de muitas variáveis ( $Y_i, i = 1, 2, \dots, p$ ) em um número bem menor de novas variáveis ( $C_k, k = 1, 2, \dots, q$ , sendo  $q < p$ ) chamadas componentes principais, conseguindo uma pequena perda de informações, e uma vez determinados os componentes principais, os seus valores numéricos, denominados de escores, foram calculados para cada elemento amostral, e a partir dos escores dos componentes principais, foi gerada a imagem de dispersão a fim de se ter uma melhor visualização de cada elemento amostral dentro do conjunto de dados.

A análise de agrupamento envolveu duas etapas, a estimação de medidas de semelhança e a adoção de um método de agrupamento. Assim, como medida de dissimilaridade adotou-se a distância Euclidiana média. Esta distância Euclidiana entre os indivíduos  $i$  e  $i'$  ( $d_{ii'}$ ) foi dada por:

$$d_{ii'} = \left[ \sum_{j=1}^p (X_{ij} - X_{i'j})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Em que:

$X_{ij}$  = valor obtido para o  $i$ -ésimo indivíduo em relação à  $j$ -ésima variável;

$X_{i'j}$  = valor obtido para o  $i'$ -ésimo indivíduo em relação à  $j$ -ésima variável;

$p$  = número de variáveis analisadas.

Sabe-se que distância Euclidiana é influenciada pela escala de medida das variáveis, pelo número de variáveis e pela correlação existente entre as mesmas. Portanto, para

contornar os inconvenientes foi adotada a padronização das variáveis, sendo utilizada a seguinte padronização:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij}}{s(X_j)}, i = 1, 2, \dots, n \text{ e } j = 1, 2, \dots, p.$$

Em que:

$X_{ij}$  = valor do i-ésimo indivíduo e j-ésima variável;

$s(X_j)$  = desvio padrão da característica  $j$ .

Além disso, a distância Euclidiana aumenta à medida que acresce o número de variáveis. Assim, para superar este problema utilizou-se a distância Euclidiana média ( $\Delta_{ii'}$ ), na qual se dividiu o valor da distância Euclidiana pela raiz quadrada do número de variáveis:

$$\Delta_{ii'} = \frac{1}{\sqrt{p}} d_{ii'}$$

O método de agrupamento utilizado foi o de Tocher (não-hierárquico), pois o número elevado de indivíduos e estimativas das distâncias entre os mesmos poderia dificultar o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual do dendograma gerados pelos métodos hierárquicos. Assim, optou-se pelo método de partição dos dados, onde cada elemento amostral foi distribuído para a formação de uma imagem de dispersão mais confiável para a observação dos padrões de divergência genética.

Desse modo, o método de otimização de Tocher se iniciou a partir da matriz de dissimilaridade, identificando-se o par de indivíduos mais similar, sendo que estes formaram o grupo inicial. Em seguida, avaliou-se a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, de forma que a distância média dos indivíduos dentro do grupo fosse menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos, o que possibilitou a formação de novos grupos com um número ótimo de indivíduos, com base nas estimativas de dissimilaridade expressas pela distância Euclidiana média calculada para cada par e/ou elemento amostral.

Como limite de acréscimo na média da distância intra-grupo para inclusão ou não de um novo elemento no grupo em formação, foi adotado como critério o valor máximo da medida de dissimilaridade, encontrado no conjunto das menores distâncias que envolvem cada indivíduo. Além disso, foram calculadas também as médias gerais das características idade ao primeiro parto (IPP), intervalo de partos (IDP), eficiência reprodutiva (ER), produção total de leite (PTL) e duração da lactação (DL) para cada um dos grupos formados pelo método de otimização de Tocher. Os grupos formados por somente um animal tiveram como base a média deste, para cada característica reprodutiva e produtiva avaliada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de Componentes Principais

Pelo fato das variáveis possuírem unidades de medida diferentes (dias, quilogramas e porcentagem), padronizou-se as variáveis originais para uma distribuição normal multivariada com média 0 e variância 1, procedendo-se primeiramente a análise de componentes principais. Segundo Morrison (1976), em virtude dos componentes principais e das distâncias Euclidianas serem influenciados pela escala das variáveis, recomenda-se utilizar variáveis padronizadas com variância igual a unidade. Esta padronização foi realizada pelo próprio software GENES<sup>®</sup>, que executa todas as funções necessárias para a aplicação das análises.

A Tabela 1 mostra a matriz de correlação entre as variáveis idade ao primeiro parto (IPP), intervalo de partos (IDP), eficiência reprodutiva (ER), produção total de leite (PTL) e duração da lactação (DL) após a padronização dos dados.

**Tabela 1.** Matriz de correlação entre as variáveis padronizadas utilizadas na análise de componentes principais.

Variáveis	IPP	IDP	ER	PTL	DL
IPP	1,0000	-0,0335	0,0071	0,0005	0,0969
IDP	-0,0335	1,0000	-0,8417	0,0402	0,0165
ER	0,0071	-0,8417	1,0000	-0,0450	-0,0041
PTL	0,0005	0,0402	-0,0450	1,0000	0,6903
DL	0,0969	0,0165	-0,0041	0,6903	1,0000

IPP = idade ao primeiro parto, IDP = intervalo de partos, ER = eficiência reprodutiva, PTL = produção total de leite e DL = duração da lactação.

Através da matriz de correlação entre as variáveis, foi possível observar algumas características que apresentaram correlação linear simples significativa com outras, podendo ser, desse modo, menos importantes para a variação total. Desse modo, a variável eficiência reprodutiva (ER) foi a menos importante para explicar esta variabilidade, por ser uma combinação linear do intervalo de partos (IDP), apresentado correlação significativa com esta variável (-0,8417). A característica produção total de leite (PTL) apresentou alta correlação com duração da lactação (DL), sendo de 0,6903, indicando que ambas não necessariamente precisam ser mantidas em estudos futuros. Por outro lado, a mesma característica produção total de leite (PTL) apresentou correlação não-significativa com intervalo de partos (IPP), sugerindo a manutenção de ambas as características em experimentos futuros, já que são igualmente importantes na caracterização dos sistemas de produção de leite

Apesar da correlação entre ER e IDP ter sido significativa, a mesma foi de natureza negativa. De fato, quanto maior for o intervalo de partos, menor será o número de bezerras produzidos ao longo da vida útil produtiva das fêmeas e, portanto, menor será a eficiência reprodutiva. A correlação de natureza negativa observada entre produção total de leite e eficiência reprodutiva (-0,0450) pode estar relacionada ao antagonismo entre ambas as características, visto que é descrito na literatura que o aumento na produção de leite pode estar relacionado ao aumento do balanço energético negativo, sendo este associado ao aumento das concentrações plasmáticas de GH e diminuição das concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1, o que impacta negativamente a esfera reprodutiva, reduzindo a sua eficiência (CHAGAS et al., 2007; LEROY et al., 2008; BARBAT et al., 2010; GRIMARD et al., 2013).

Foram obtidos cinco componentes principais, dos quais os três primeiros explicaram 90,79% da variação total dos dados, demonstrando que a técnica dos componentes principais foi efetiva para reter, em ordem de estimação, o máximo possível de informação, em termos de variação total contida nos dados iniciais. O primeiro componente explicou 37,18%, o segundo 33,63% e o terceiro 19,97% da variância total, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Componentes principais, autovalores, percentagem da variância explicada pelos componentes e percentagem acumulada da variância explicada pelos componentes.

<b>Componentes principais</b>	<b>Autovalores</b>	<b>%VCP</b>	<b>%VCP (Acumulada)</b>
CP1	1,8590	37,18	37,18
CP2	1,6819	33,63	70,81
CP3	0,9986	19,97	90,79
CP4	0,3032	6,06	96,85
CP5	0,1572	3,14	100,00

CP = componentes principais.

%VCP = percentagem de variação explicada pelos componentes.

Como pode ser observado na Tabela 2, houve redução das variáveis originais em três componentes, dos quais dois (40,00% das características avaliadas) apresentaram variância (autovalor) inferior a 0,7, sendo, portanto, passíveis de descarte, de acordo com o critério proposto por Jolliffe (1972, 1973), que relatam que quando a análise dos componentes principais usa a matriz de correlação, o número de variáveis descartadas deveria ser menor ou igual ao número de componentes cuja variância é inferior a 0,7. Assim, torna-se possível descartar as variáveis que pouco contribuem para a discriminação dos dados. O mesmo critério foi utilizado por Barbosa et al. (2006) e Santos et al. (2010) para o descarte de variáveis. No entanto, o objetivo deste trabalho não foi trabalhar no sentido de descarte de variáveis, já que não se tratou de um grande número de variáveis. Desse modo, esta análise possibilitou a discriminação das características mais importantes e menos importantes para a variabilidade total do conjunto dos dados, com maior ou menor relevância.

A importância relativa das variáveis pode ser avaliada pela magnitude da correlação destas variáveis com os primeiros e os últimos componentes estimados, os quais apresentam maior ou menor relevância. Assim, as duas variáveis que apresentaram maiores correlações, a partir da função linear referente ao último componente principal em direção ao primeiro, foram eficiência reprodutiva (-0,2798) e duração da lactação (0,3880), conforme Tabela 3. Porém, a característica duração da lactação apresentou alta correlação com o segundo componente principal (0,8824), que foi responsável por 33,63% da variação total.

**Tabela 3.** Correlações entre as variáveis e os componentes principais (CP) estimados.

<b>Correlações</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>	<b>CP4</b>	<b>CP5</b>
<b>IPP</b>	-0,0135	0,1420	<b>0,9883</b>	-0,0522	-0,0111
<b>IDP</b>	<b>0,9214</b>	-0,2673	0,0158	0,0353	-0,2794
<b>ER</b>	-0,9201	0,2693	-0,0461	0,0205	<b>-0,2798</b>
<b>PTL</b>	0,3045	0,8598	-0,1394	-0,3851	-0,0184
<b>DL</b>	0,2653	<b>0,8824</b>	-0,0043	<b>0,3880</b>	0,0204

IPP = idade ao primeiro parto, IDP = intervalo de partos, ER = eficiência reprodutiva, PTL = produção total de leite e DL = duração da lactação.

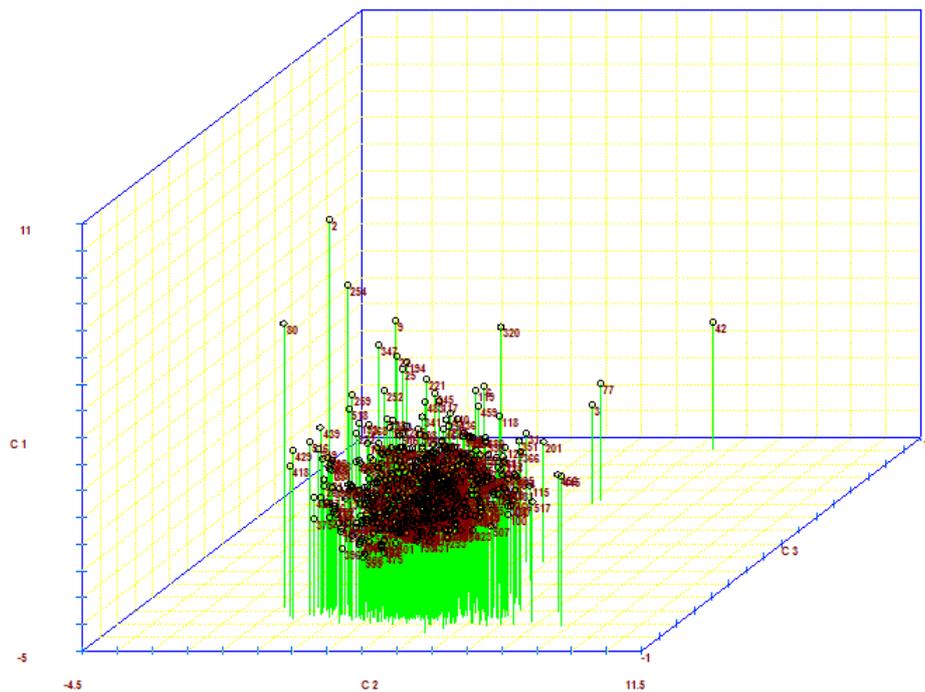
Os componentes principais estimados permitiram identificar a importância das características em relação ao percentual de explicação da variação total dos dados. Nesse sentido, as características consideradas mais relevantes para a caracterização do conjunto dos dados, na ordem da mais importante para a menos importante, foram intervalo de partos (IDP), duração da lactação (DL), idade ao primeiro parto (IPP), produção total de leite (PTL) e eficiência reprodutiva (ER), sendo essas duas últimas menos importantes para a variação total, por estarem altamente correlacionadas com os componentes CP4 e CP5. A razão para isso é que variáveis altamente correlacionadas aos componentes principais de menor variância representam variação praticamente insignificante (MARDIA et al., 1997).

Desse modo, os três primeiros componentes principais (CP1, CP2 e CP3) foram utilizados para contrastar as fêmeas de maiores ou menores desempenhos médios para as características com os quais os mesmos foram correlacionados. Portanto, as variáveis IDP, DL e IPP foram associadas ao CP1, CP2 e CP3, respectivamente. Além disso, as variáveis IDP e ER foram mais associadas ao CP1, indicando que estas possuíram maior interdependência genética entre si, enquanto que PTL e DL foram mais associadas ao CP2 e IPP ao CP3 (Tabela 3). Estes resultados indicaram que mudanças genéticas em uma das variáveis associadas ao CP1 ou CP2 podem ocasionar mudanças genéticas de mesmo sentido na outra, exceto para IPP, que foi mais associada ao CP3. Logo, a IPP possui pouca associação genética com as demais variáveis analisadas. Assim, as fêmeas podem ser selecionadas por meio dos escores numéricos gerados por CP1 e CP2 para melhorar produtivamente IDP, ER, PTL e DL, e pelos escores obtidos por CP3 para melhorar a IPP.

Santos et al. (2010) utilizaram a análise de componentes principais para avaliarem a formação de grupos produtivos em fêmeas da raça Girolanda de três grupamentos genéticos (1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Gir) com o objetivo de discriminar as características mais importantes para a produção de leite na referida raça. Estes autores discriminaram três componentes, que foram responsáveis por 82,84% da variação total dos dados, estando correlacionados com as três características não passíveis de descarte neste estudo, sendo grupo genético (CP1), peso do leite na terceira ordenha (CP2) e idade da vaca na data do controle leiteiro (CP3). Desse modo, a análise dos componentes principais, além de ser importante para a discriminação das características mais relevantes no conjunto de dados, pode indicar também aquelas menos relevantes e, portanto, passíveis de serem descartadas em programas de melhoramento genético quando se tem uma maior número de variáveis e se necessita eliminar as mais redundantes, a fim que se possa ter uma melhor visualização da separação dos grupos de fêmeas através dos componentes retidos.

Miranda & Jangarelli (2014) empregaram a técnica dos componentes principais para avaliarem a contribuição relativa das características em um conjunto de dados de animais da raça Girolando com ordem de parto de 1ª até a 10ª. Estes autores discriminaram três componentes principais, que explicaram 96,55% da variabilidade total dos dados, sendo que as características mais importantes e, conseqüentemente, altamente correlacionadas com estes foram idade ao parto (CP1), duração da lactação (CP2) e produção diária de leite (CP3), o que torna válida a metodologia utilizada no presente estudo, onde foi possível a identificação das características idade ao parto e duração da lactação como sendo altamente importantes para os sistemas cujo objetivo seja obter maiores produções totais de leite durante a vida útil produtiva das matrizes. No entanto, convém destacar que extrapolações de estudos com as análises multivariadas não são válidas, uma vez que todos os valores estimados são específicos para cada estudo e não podem ser comparados com amostras e populações que não foram envolvidas nas análises do presente estudo.

A imagem de dispersão gerada pela análise dos componentes principais é apresentada na Figura 1, onde se evidenciou a visualização das fêmeas dentro do conjunto total dos animais. Utilizando-se os escores dos componentes principais 1, 2 e 3, os mesmos foram contrastados três a três (CP1, CP2 e CP3), demonstrando uma projeção tridimensional, onde pode ser observada a separação das matrizes da raça Sindi, após a padronização dos dados. Desse modo, pela análise do referida imagem, observou-se uma grande homogeneidade entre os animais para os componentes avaliados, com alguns poucos animais se distanciando da média em relação às outras fêmeas, que foi posteriormente visualizado pela análise de agrupamentos para a formação dos grupos produtivos.



**Figura 1.** Dispersão visual dos animais contrastando-se os componentes 1 (CP1=IDP), 2 (CP2=DL) e 3 (CP3=IPP).

De fato, pela análise da Figura 1, as fêmeas com os genótipos 2, 42 e 80 apresentaram a máxima diversidade por situarem-se graficamente mais distantes, sendo, portanto, mais divergentes em relação às outras fêmeas. Embora este tipo de análise seja de grande importância em estudos de divergência genética em que se procura identificar matrizes a serem utilizados em programas de acasalamento para a obtenção de progênie com maior produção em relação aos pais, a recomendação de acasalamentos com a utilização de fêmeas mais divergentes só deverá ser feita após uma análise criteriosa de seus desempenhos médios em relação a cada uma das características reprodutivas e produtivas avaliadas.

Além disso, também foi observado que a alta proximidade entre as fêmeas dificultou a visualização daquelas mais parecidas produtivamente, confirmando a eficiência da análise de componentes principais, em que os três primeiros componentes (CP1, CP2 e CP3) foram suficientes para representar a separação das fêmeas.

## 4.2 Análise de Agrupamento

Para o reconhecimento dos grupos produtivamente homogêneos, foi utilizada a análise multivariada de agrupamento por meio do método de otimização de Tocher. O agrupamento das 560 fêmeas por meio deste método, com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média, permitiu o estabelecimento de doze grupos, que facilitam a visualização de divergência entre os animais, vistas com o mesmo padrão de similaridade, conforme Tabela 4. Conforme mencionado anteriormente e confirmado por meio desta análise, as fêmeas 2, 42 e 80 formaram grupos distintos e mutualmente exclusivos, individualmente.

**Tabela 4.** Grupos de fêmeas da raça Sindi estabelecidos pelo método de otimização de Tocher com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média padronizada.

Grupos	N	Genótipos
1	429	192, 219, 127, 104, 248, 520, 375, 556, 297, 447, 356, 426, 263, 165, 281, 392, 85, 195, 68, 131, 325, 108, 203, 386, 29, 76, 488, 46, 417, 241, 27, 419, 500, 407, 299, 83, 402, 384, 266, 43, 313, 184, 258, 89, 399, 398, 415, 223, 435, 528, 405, 519, 368, 53, 45, 61, 344, 421, 514, 332, 225, 48, 521, 308, 558, 97, 5, 358, 416, 262, 410, 216, 450, 240, 93, 204, 44, 413, 425, 71, 269, 472, 550, 323, 26, 73, 47, 264, 191, 56, 41, 13, 198, 510, 1, 151, 156, 362, 403, 333, 270, 509, 138, 49, 218, 179, 327, 486, 96, 538, 69, 328, 324, 227, 113, 177, 169, 307, 228, 230, 409, 217, 122, 211, 166, 207, 463, 551, 492, 285, 142, 188, 314, 348, 279, 160, 161, 91, 350, 55, 451, 489, 147, 390, 522, 128, 255, 178, 329, 15, 21, 267, 482, 537, 560, 273, 157, 173, 287, 51, 95, 237, 493, 317, 24, 88, 494, 548, 342, 474, 549, 397, 460, 257, 146, 99, 535, 8, 132, 484, 322, 78, 65, 495, 557, 58, 172, 52, 243, 134, 394, 414, 433, 539, 239, 33, 40, 170, 312, 148, 374, 411, 140, 382, 159, 364, 175, 197, 289, 220, 505, 102, 143, 502, 432, 559, 36, 154, 190, 387, 251, 369, 278, 542, 155, 212, 280, 276, 352, 523, 130, 293, 541, 512, 331, 144, 457, 401, 428, 391, 527, 265, 291, 371, 14, 126, 162, 50, 64, 292, 487, 490, 116, 209, 90, 544, 330, 176, 4, 193, 353, 452, 114, 545, 215, 242, 149, 181, 393, 38, 458, 183, 86, 98, 552, 79, 72, 275, 420, 139, 288, 277, 82, 12, 57, 101, 310, 200, 479, 359, 395, 206, 274, 199, 504, 443, 205, 141, 226, 137, 381, 444, 301, 30, 124, 210, 185, 87, 378, 442, 305, 158, 18, 424, 477, 286, 19, 336, 187, 63, 284, 385, 174, 16, 318, 208, 453, 372, 339, 110, 247, 326, 54, 163, 246, 136, 233, 306, 167, 20, 478, 28, 112, 271, 202, 250, 303, 180, 260, 357, 229, 213, 476, 125, 346, 354, 383, 355, 32, 311, 66, 473, 316, 349, 449, 309, 282, 319, 376, 431, 70, 379, 37, 145, 412, 182, 189, 534, 302, 321, 283, 171, 290, 152, 365, 92, 434, 168, 377, 462, 84, 261, 164, 465, 335, 23, 461, 497, 367, 360, 253, 135, 34, 35, 511, 438, 427, 244, 506, 7, 471, 234, 531, 400, 389, 39, 468, 17, 501, 526, 106, 513, 150, 60, 373, 525, 543, 11, 343
2	63	214, 464, 232, 296, 341, 515, 408, 483, 337, 340, 119, 245, 508, 222, 499, 10, 436, 469, 533, 554, 236, 546, 118, 524, 454, 186, 459, 62, 6, 67, 532, 530, 440, 380, 441, 129, 351, 315, 437, 422, 224, 555, 366,

**Tabela 4.** Grupos de fêmeas da raça Sindi estabelecidos pelo método de otimização de Tocher com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana média padronizada (Continuação).

<b>2</b>	<b>63</b>	107, 467, 363, 455, 294, 529, 334, 370, 74, 536, 361, 75, 300, 121, 59, 540, 31, 201, 105, 466
<b>3</b>	<b>23</b>	338, 406, 498, 249, 516, 429, 298, 231, 439, 418, 235, 272, 496, 153, 109, 259, 238, 518, 268, 133, 252, 345, 117
<b>4</b>	<b>15</b>	485, 491, 553, 388, 103, 475, 503, 81, 196, 111, 396, 123, 470, 446, 94
<b>5</b>	<b>8</b>	25, 194, 22, 9, 347, 221, 254, 320
<b>6</b>	<b>13</b>	404, 448, 256, 100, 480, 507, 115, 547, 120, 423, 304, 481, 517
<b>7</b>	<b>2</b>	445, 456
<b>8</b>	<b>2</b>	3, 77
<b>9</b>	<b>2</b>	295, 430
<b>10</b>	<b>1</b>	42
<b>11</b>	<b>1</b>	80
<b>12</b>	<b>1</b>	2

N = número de indivíduos em cada grupo.

O método de agrupamento de Tocher possibilitou a agregação de 429 fêmeas, ou seja, 76,60% dos genótipos, no grupo 1, indicando uma forte homogeneidade dentro deste grupo. Isto indica que, embora haja genótipos com grande divergência genética entre si, mais da metade é similar para as características avaliadas, evidenciando um grau estreito de relação entre elas. Tal resultado seria esperado, uma vez que, apesar dos animais serem procedentes de 28 rebanhos diferentes, praticamente existem somente dois núcleos de criação da raça no país (regiões Nordeste e Sudeste), que podem ter sido os responsáveis pela dispersão da maioria das fêmeas para os outros estados e regiões. Dessa maneira, os produtores podem ter utilizado para a formação de seus rebanhos as mesmas fêmeas consideradas superiores, o que contribuiu para a formação de um grupo com um grande número de animais produtivamente homogêneos para as características reprodutivas e produtivas avaliadas. Portanto, a formação de grupos representa valiosa informação na escolha das matrizes dentro dos programas de melhoramento, pois as novas populações a serem estabelecidas devem ser baseadas na magnitude de suas distâncias e no potencial por si só dessas matrizes.

Em programas que buscam a obtenção de animais superiores é necessária uma considerável divergência genética entre os animais e que estes tenham médias favoráveis para as características a serem melhoradas. Desse modo, foram estimadas as maiores e menores distâncias Euclidianas médias entre as fêmeas baseadas nos dados originais das características idade ao primeiro parto (IPP), intervalo de partos (IDP), eficiência reprodutiva (ER), produção total de leite (PTL) e duração da lactação (DL). As estimativas evidenciaram os graus de similaridade e de dissimilaridade entre as fêmeas avaliadas, e os resultados

mostraram que a maior dissimilaridade ocorreu entre as fêmeas 2 e 196 (distância euclidiana média de 0,6800) e a maior similaridade entre as fêmeas 192 e 219 (distância euclidiana média de 0,0040). De fato, as fêmeas 2 e 196 mais distantes foram provenientes de estados diferentes (PB e MG) e filhas de pais de diferentes origens (PB e SP), apresentando médias das características bastante divergentes, o que contribuiu para o maior distanciamento entre ambas, sendo provenientes de grupos distintos. Por serem de diferentes localidades, podem ter sido submetidas a diferentes condições de manejo, clima e alimentação. Ao contrário, as fêmeas 192 e 219 mais próximas foram provenientes do mesmo estado de criação (MG), sendo filhas de pais de mesma origem (SP), apresentando médias das características bastante semelhantes, o que contribuiu para a maior proximidade entre ambas, sendo que, de fato, pertenciam ao mesmo grupo. Isto pode ser devido ao fato de que estas fêmeas podem ter sido submetidas a um mesmo tipo de manejo alimentar e clima.

No intuito de se comparar o rendimento dos grupos de fêmeas, foram estimadas as médias das características idade ao primeiro parto (IPP), intervalo de partos (IDP), eficiência reprodutiva (ER), produção total de leite (PTL) e duração da lactação (DL) conforme Tabela 5. Sabe-se que melhores desempenhos médios em determinadas características podem fornecer informações para a melhor escolha dos animais quanto à variável de interesse.

**Tabela 5.** Médias das características dos 12 grupos formados pelo agrupamento de Tocher.

<b>Grupos</b>	<b>IPP (Dias)</b>	<b>IDP (Dias)</b>	<b>ER (%)</b>	<b>PTL (Kg)</b>	<b>DL (Dias)</b>
1	1242,90	523,77	71,75	1439,23	214,84
2	1326,09	651,49	59,46	2809,75	319,03
3	1205,82	893,76	42,13	908,06	131,87
4	1198,40	409,66	89,40	576,80	76,70
5	1267,75	1556,68	24,24	2315,70	284,99
6	1451,38	404,40	90,52	2266,89	326,10
7	1265,00	478,00	76,39	6016,55	324,50
8	5375,50	489,00	74,95	1390,05	230,00
9	2122,50	427,57	85,51	3009,25	177,00
10	7370,00	539,38	67,67	1495,20	356,00
11	1119,00	2008,76	18,17	693,60	68,00
12	817,00	3919,50	12,09	2125,20	276,00
Mínimo	405,00	366,00	12,08	45,60	15,00
Máximo	7370,00	3019,50	99,72	6329,60	365,00

IPP = idade ao primeiro parto, IDP = intervalo de partos, ER = eficiência reprodutiva, PTL = produção total de leite e DL = duração da lactação.

Pelos dados apresentados na Tabela 5, os doze diferentes grupos apresentaram desempenhos médios particulares para cada uma das características avaliadas, o que pode direcionar os trabalhos seletivos em cada grupo em função da quantidade ou porcentagem de matrizes ideais zootecnicamente, ou seja, o quanto cada fêmea pode apresentar em termos de eficiência e produtividade nos diversos rebanhos e sistemas de produção de leite. Desse modo, os grupos 2 (63 fêmeas), 5 (8 fêmeas), 6 (13 fêmeas), 7 (2 fêmeas), 9 (2 fêmeas) e 12 (1 fêmeas), ou seja, 50,00% dos grupos, apresentaram média de produção total de leite (PTL) acima de 2000 Kg, com destaque para os grupos 7 e 9. Estes dois grupos foram formados por somente duas fêmeas cada, que provavelmente se destacaram na produção leiteira por serem

procedentes de estados da região Nordeste (CE e PB), onde vem sendo submetidos a um manejo e direcionamento cujo foco é melhorar geneticamente esta produção, o que de fato tem sido observado na evolução dos rebanhos Sindi no Nordeste. Entre os grupos com melhores desempenhos médios para a idade ao primeiro parto (IPP), destacaram-se os grupos 11 e 12, sendo que estes foram formado por somente uma fêmea cada (genótipo 80 e 2, respectivamente), onde a fêmea de genótipo 2 apresentou IPP de aproximadamente 27 meses. Estas duas fêmeas foram procedentes de um estado da região Nordeste (PB), que também tem direcionado a raça Sindi para precocidade sexual.

No presente estudo, observou-se que uma maior eficiência reprodutiva (ER) não necessariamente implicou em uma maior produção total de leite (PTL), tal como foi confirmado pela análise dos componentes principais (-0,0450) e visto pelas médias dos grupos 4, 5, 10 e 12. O grupo 4, por exemplo, apresentou a média de ER maior do que o grupo 5, mas a PTL desde grupo foi menor em relação ao grupo 5, sendo que o mesmo foi observado entre os grupos 10 e 12. Isto pode estar relacionado aos diferentes desempenhos médios para intervalo de partos (IDP), onde a ER está diretamente relacionada ao intervalo de parições das fêmeas, ou seja, quanto menor é o IDP, maior será o número de produtos e, conseqüentemente, maior será a ER, tal como foi observado pelos grupos 4, 6, 7, 8 e 9. O grupo 12 apresentou o pior desempenho para ER por ter maior IDP (3919 dias), ao passo que o grupo 6 demonstrou o melhor desempenho para ER por ter apresentado menor IDP (404 dias), próxima à média ideal para os sistemas de produção de leite, que é 365 dias (12 meses).

Com relação à duração da lactação (DL), o período preconizado para raças leiteiras é de aproximadamente 10 meses, para que se tenha um parto por ano e maior produção de leite por vaca durante sua vida produtiva. Desse modo, torna-se necessário considerar a duração da lactação (DL) como uma variável a ser estudada nos aspectos genéticos e ambientais, a despeito de sua alta correlação com a produção de leite, a fim de se poder utilizar na seleção de vacas leiteiras, principalmente nos países de clima quente (NOBRE et al., 1984; MILAGRES et al., 1988; VASCONCELOS et al., 1989; BARBOSA et al., 1994; GUIMARÃES et al., 2002). No presente estudo, a DL se mostrou fortemente correlacionada com a produção total de leite (0,6903). De fato, os grupos que apresentaram menores médias de produção total de leite, apresentaram também menores médias dos períodos em lactação, conforme Tabela 5. Os grupos que apresentaram duração da lactação inferior a 200 dias foram representados por fêmeas que podem ter tido sua lactação interrompida por algum processo ou sofrido intervenção nos sistemas de manejo durante o período de avaliação.

Foi calculada a contribuição relativa das variáveis para a divergência entre as fêmeas utilizando-se o critério proposto por Singh (1981), conforme Tabela 6. Os valores percentuais da variância denotada por  $S_j$  constituem a medida da importância relativa da variável  $j$  para o estudo da diversidade genética (CRUZ, 2006).

A análise de agrupamento considera as distâncias entre os indivíduos para a formação dos grupos e estas distâncias, por sua vez, são influenciadas pelas características que apresentam maior variabilidade no conjunto de dados. Dessa forma, foi possível observar as características mais importantes para a variabilidade dos dados, segundo critério proposto por Singh (1981), indicando uma maior eficiência de seleção para as características produção total de leite (PTL), com 71,92% da variação, e idade ao primeiro parto (IPP), com 23,06% da variação total. As características com menor variabilidade e portanto consideradas menos importantes para a variação total foram intervalo de partos (IDP), duração da lactação (DL) e eficiência reprodutiva (ER), com 4,37; 0,61 e 0,02% da variação total, respectivamente, conforme Tabela 6. Assim, evidenciou-se a aproximação e o distanciamento entre os grupos para os desempenhos em PTL, indicando que tal característica se destaca na diferenciação dos

grupos e que tais grupos poderiam ser referenciais para serem utilizados em programas de melhoramento genético, cujo foco seja a obtenção de maiores produções totais de leite.

**Tabela 6.** Contribuição relativa das características para a divergência entre 560 fêmeas da raça Sindi pelo método de Singh (1981).

Característica	Variância ( $S_j$ )	Valor (%)
PTL	248296894892,4695	71,9206
IPP	79618758911,0	23,0620
IDP	15105771881,8236	4,3755
DL	2139860196,6864	0,6198
ER	76393968,6991	0,0221

IPP = idade ao primeiro parto, IDP = intervalo de partos, ER = eficiência reprodutiva, PTL = produção total de leite e DL = duração da lactação.

Segundo dados relatados na literatura, a idade ao primeiro parto (IPP) tem grande importância para os sistemas de produção de leite, sendo que, quanto menor for esta, mais cedo a fêmea tornar-se-á produtiva, possibilitando maior número de gestações durante sua vida útil, e maior intensidade de seleção, o que refletirá em maior produção de leite. Ao contrário, quando elevada em geral, traduz falta de adaptação do animal ao seu ambiente, com consequente redução de sua vida útil produtiva (PELICIONI et al., 1999; FACÓ et al., 2005; COELHO et al., 2009; VIEIRA et al., 2010). No presente estudo, as características produção total de leite (PTL) e idade ao primeiro parto (IPP) foram as características que mais contribuíram para a formação dos grupos de fêmeas. Silva et al. (1998); Wenceslau et al. (2000) e Miranda & Jangarelli (2014), ao avaliarem animais de genótipo zebuino ou mestiços Holandês x Zebu, observaram que ambas as características foram altamente correlacionadas.

Entre os fatores que podem influenciar a produção de leite, um destes é a ordem de parto, pois sabe-se que em animais jovens, parte da energia ingerida é desviada para o crescimento e desenvolvimento corporal, portanto, as máximas produções são obtidas quando estas encerram a sua fase de crescimento, o que em geral ocorre entre a terceira e quarta lactação. Na idade adulta, sua capacidade orgânica encontra-se plenamente desenvolvida e, neste caso, os nutrientes são direcionados principalmente para os processos de manutenção, produção e reprodução (TEORODO et al., 2000; CARVALHO et al., 2001; FREITAS et al., 2001). Soares et al. (2009) observaram que a ordem de parto influenciou a produção de leite na raça Sindi, ocorrendo uma elevação da produção até a sexta ordem. Do mesmo modo, Galvão Júnior et al. (2010) observaram uma correlação positiva entre ordem de parto e produção de leite na raça Sindi, indicando diferenças entre primíparas e múltíparas. Guimarães et al. (2002) observaram que a ordem de parto afetou a produção de leite em animais da raça Gir, os quais observaram superioridade das vacas de segunda e demais ordens quanto às produções inicial e máxima, o que poderia ser explicado pelo fato dessas classes possuírem animais mais próximos da maturidade fisiológica. No entanto, Barros (2014) não observou efeito da ordem de parto sobre a produção de leite na raça Sindi.

No presente estudo, foram avaliadas fêmeas nascidas entre 1987 a 2011, ou seja, de 4 a 28 anos, e de diferentes ordens de parto, de 1ª até a 17ª ordem. Ao se avaliarem as fêmeas de acordo com a idade e a ordem de parto, observou-se que não necessariamente as fêmeas mais velhas foram as que apresentaram maiores ordens de parto e, conseqüentemente, maiores produções totais de leite. As fêmeas podem ser mais velhas, ou seja, apresentarem maior idade, mas podem ter tido o seu primeiro parto a uma idade mais avançada (maior IPP),

fazendo com que estas tivessem um menor número de parições e de lactações durante sua vida útil, o que pode refletir em uma menor produção total de leite. Isso pode ser observado entre os grupos 5 e 7 (Tabela 5), onde as fêmeas do grupo 7 apresentaram menor idade fisiológica que as do grupo 5, mas apresentaram maior produção total de leite (PTL) que as do grupo 5, talvez pelo fato de serem mais precoces (menor IPP), o que fez com que iniciassem a vida útil reprodutiva mais cedo e, conseqüentemente, produzissem mais quilos de leite durante o período de avaliação. Convém observar que estas fêmeas apresentaram a mesma ordem de parto, mas pelas diferenças demonstradas pelas características IPP e IDP (as fêmeas do grupo 7 tiveram menor IDP), evidenciou-se que estas fêmeas alcançaram, em um menor intervalo de vida útil, maior média de produção total de leite (PTL) em relação às fêmeas do grupo 5.

Sabe-se que o intervalo de partos (IDP) interfere no número de parições e, conseqüentemente, na produção total de leite (PTL), sendo que no presente estudo esta variável apresentou uma contribuição de 4,37% para a discriminação das fêmeas e grupos formados. Além disso, observaram-se as características duração da lactação (DL) e eficiência reprodutiva (ER) como responsáveis por uma pequena porcentagem da variação total (Tabela 6). A variável ER demonstrou a menor porcentagem (0,02%) por ser uma característica altamente influenciada pelo meio ambiente, cuja resposta será reflexo de intervenções e melhorias nos sistemas de manejo. Portanto, estes dados reforçam os obtidos com a análise de componentes principais, que discriminou os três primeiros componentes e os correlacionou com intervalo de partos (CP1), duração da lactação (CP3) e idade ao primeiro parto (CP3), contrastando fêmeas de maiores ou menores desempenhos médios nestas características.

O presente estudo foi o primeiro a relatar o emprego de técnicas multivariadas em características de desempenho na raça Sindi para a produção de leite. Neste trabalho, a idade ao primeiro parto foi altamente correlacionada com os componentes mais importantes das análises, indicando que esta característica tem relevante contribuição para a otimização e caracterização dos sistemas de produção de leite empregados na raça Sindi, que almejam animais sexualmente mais precoces e, conseqüentemente, com maiores produções de leite ao longo de sua vida útil. Assim, com base nos resultados das médias observadas na Tabela 5, as fêmeas dos grupos 7 e 9 (maior PTL) e dos grupos 11 e 12 (menor IPP) poderão ser utilizadas em rebanhos cujo foco seja produção de leite e precocidade sexual. Isto pode ser decorrente do fato de que grande parte da população desta raça é proveniente da região Nordeste, que tem voltado seus métodos de seleção para produção de leite e precocidade sexual.

Desse modo, o presente estudo pode ter grande relevância para a formação de lotes ou grupos produtivos e o gerenciamento de rebanhos da raça Sindi, pois envolveu aspectos relacionados à divergência genética e possível variabilidade entre as populações de fêmeas. De acordo com Santos (2011), quanto maior for a distância ou diversidade genética, maior poderá ser a heterose ou vigor híbrido e, conseqüentemente, maior a capacidade de transmissão de genes relacionados à produção de leite entre as gerações. Estes efeitos serão maiores nas características de baixa herdabilidade, ou seja, naquelas que são muito influenciadas pelo meio ambiente e, por conta disso, apresentam menor resposta ao processo de seleção, tais como as características reprodutivas IPP, IDP e ER. Portanto, observou-se a diversidade entre as 560 fêmeas da raça Sindi, e os diferentes rebanhos, com as respectivas porcentagens de fêmeas com aptidão para leite, poderão ser encaminhados para trabalhos de cruzamento e explorados com base nos melhores desempenhos médios que poderão alcançar para as características produção total de leite e precocidade sexual.

## **5 CONCLUSÕES**

As técnicas multivariadas promoveram maior facilidade na identificação dos animais ou grupos mais adequados para o sistema de produção de leite.

As características produção total de leite e idade ao primeiro parto foram as mais importantes para a divergência entre as fêmeas.

Os processos seletivos têm sido voltados para a produção de leite e precocidade sexual, devido a tendência para o progresso genético dessas características na raça Sindi.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU (ABCZ). **Dados do efetivo nacional da raça Sindi**. Disponível em: <abcz.org.br.br>. Acesso em: 18 fev. 2016.
- ABREU, V.M.N.; SILVA, M.A.; CRUZ, C.D.; FIGUEIREDO, E.A.P.; ABREU, P.G. Desempenho e predição de híbridos e análise de agrupamento de características de matrizes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.617-626, 2002.
- AZEVÊDO, D.M.M.R.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.N.B.; MALHADO, C.H.M.; LÔBO, R.B.; MOURA, A.A.A.; PIMENTA FILHO, E.C. Desempenho reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.988-996, 2006.
- BARBAT, A.; Le MEZEC, P.; DUCROCQ, V.; MATTALIA, S.; FRITZ, S.; BOICHARD, D.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.15-21, 2010.
- BARBOSA, S.B.P.; MANSO, H.C.; SILVA, L.O.C. Estudo do período de lactação em vacas Holandesas no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.3, p.465-475, 1994.
- BARBOSA, L.; LOPES, P.S.; REGAZZI, A.J.; GUIMARÃES, S.E.F.; TORRES, R.A. Avaliação de características de qualidade da carne de suínos por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1639-1645, 2006.
- BARROS, R.R.O. **Eficiência reprodutiva e produção de leite em bovinos da raça Sindi (*Bos taurus indicus*)**. Seropédica: UFRRJ. 2014. 36p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2014.
- BARROSO, L.P.; ARTES, R. **Análise Multivariada**. Lavras: UFLA, 2003. 157p.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.479-486, 2004.
- BELLO, A.B.S.; FERRAZ FILHO, P.B.; SILVA, L.O.C.; SOUZA, J.C.; MUNIZ, N.M. Distâncias genéticas entre touros Nelore de Mato Grosso do Sul, utilizando análise multivariada. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.64-72, 2008.
- BIGNARD, A.B. **Modelos para estimação de componentes de (co)variância para produção de leite no dia do controle de vacas da raça holandesa**. Jaboticabal: UNESP. 2010. 71p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), 2010.

CARDOSO, V.; ROSO, V.M.; SEVERO, J.L.P.; QUEIROZ, S.A.; FRIES, L.A. Formando lotes uniformes de reprodutores múltiplos e usando-os em acasalamentos dirigidos, em populações Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.834-842, 2003.

CARVALHO, G.; FREITAS, A.F.; VALENTE, J.; AZEVEDO, P.C.N. Fatores de ajustamento da produção de leite, de gordura e de proteína para idade em bovinos mestiços europeu-zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, 2001.

CHAGAS, L.M.; BASS, J.J.; BLACHE, D.; BURKE, C.R.; KAY, J.K.; LINDSAY, D.R.; LUCY, M.C.; MARTIN, C.B.; MEIER, S.; RHODES, F.M.; ROCHE, J.R.; THATCHER, W.W.; WEBB, R. Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4022-4032, 2007.

COELHO, J.G.; BARBOSA, P.F.; TONHATI, H.; FREITAS, M.A.R. Análise das relações da curva de crescimento e eficiência produtiva de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2346-2353, 2009.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ. 1990. 188p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 1990.

CRUZ, C.D.; REGAZZI A.J. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV. Viçosa (MG), 2006. 175p.

FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; MARTINS FILHO, R.; LIMA, F.A.M. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1920-1926, 2005.

FERRAZ FILHO, P.B.; SILVA, L.O.C.; SOUZA, J.C.; MALHADO, C.H.M. Divergência genética de touros Nelores com sêmen disponível em centrais de inseminação no Brasil. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006.

FERRAZ FILHO, P.B.; SILVA, L.O.C.; SOUZA, J.C.; MALHADO, C.H.M. Divergência genética de touros Nelore com sêmen disponível em centrais de inseminação no Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.16, n.1, p.25-31, 2008.

FISHER, R.A. The use of multiple measurements in taxonomic problems. **Annals of Eugenics**, v.7, n.2, p.179-188, 1936.

FREITAS, M.S.; DURÃES, M.C.; FREITAS, A.F. Comparação da produção de leite e de gordura e da duração da lactação entre cinco graus de sangue originados de cruzamentos entre Holandês e Gir em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.708-713, 2001.

FREITAS, A.R.; SOUZA, J.F. MOREIRA, A. Predição da precocidade sexual em bovinos da raça Nelore por meio dos componentes principais. **Revista de Ciências Agrárias**, v.54, p.153-158, 2011.

GALVÃO JÚNIOR, J.G.B.; RANGEL, A.H.N.; MEDEIROS, H.R.; SILVA, J.B.A.; AGUIAR, E.M.; MADRUGA, R.C.; LIMA JÚNIOR, D.M. Efeito da produção diária e da ordem de partos na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.1, p.25-30, 2010.

GRIMARD, B.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; REMY, D.; RICHARD, C.; NUTTINCK, F.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A.A. Postpartum variations of plasma IGF and IGFbps, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p.183-194, 2013.

GUIMARÃES, J.D.; ALVES, N.G.; COSTA, E.P.; SILVA, M.R.; COSTA, F.M.J.; ZAMPERLINI, B. Eficiências reprodutiva e produtiva em vacas das raças Gir, Holandês e cruzadas Holandês x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.641-647, 2002.

HAIR Jr., J.F.; BLACK, W. C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E. **Multivariate data analysis**. 7 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2009. 816 p.

HARTIGAN, J.A. **Clustering algorithms**. New York: Wiley, 1975. 351p.

HARTIGAN, J.A.; WONG, M.A. Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm. **Journal of Applied Statistics**, v.28, p.100-108, 1979.

HOTELLING, H. The most predictable criterion. **Journal of Educational and Psychology**, v.26, p.139-142, 1935.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. I. Artificial data. **Applied Statistics**, v.21, p.160-173, 1972.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. II. Real data. **Applied Statistics**, v.22, p.21-31, 1973.

KIRKPATRICK, M.; MEYER, K. Direct estimation of genetic principal components: simplified analysis of complex phenotypes. **Genetics**, v.168, p.2295-2306, 2004.

LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; Van KNEGSEL, A.T.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P.E. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.96-103, 2008.

MARDIA, K.V.; KENT, J.T.; BIBBY, J.M. **Multivariate analysis**. 6.ed. London: Academic Press, 1997. 518p.

MASCIOLI, A.S.; EL FARO, L.; ALENCAR, M.M.; FRIES, L.A. BARBOSA, P.S. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos e análise de componentes principais para características de crescimento na raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1654-1660, 2000.

MATTAR, M.; ALENCAR, M.M.; CARDOSO, F.F.; FERRAUDO, A.S.; SILVA, L.O.C.; ESPASANDIN, A.C. Utilização de técnicas estatísticas multivariadas para definição de ambiente de produção do peso ao sobreano para o estudo da interação genótipo-ambiente em bovinos Canchim. In: 45<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Lavras, MG, 2008. **Anais...** Lavras: SBZ, 2008, p.1-3.

MEYER, K. Random regression analyses using B-splines to model growth of Australian Angus cattle. **Genetics of Selection and Evolution**, v.37, p.473-500, 2005.

MEYER, K. Multivariate analyses of carcass traits for Angus cattle fitting reduced rank and factor analytic models. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, p.50-63, 2007.

MILAGRES, J.C.; ALVES, A.J.R.; TEIXEIRA, N.M. Influência de fatores genéticos e de meio sobre a produção de leite de vacas mestiças das raças Holandesa, Jersey e zebu. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.17, n.4, p.329-340, 1988.

MINGOTI, S.A. **Análise de Dados através de Estatística Multivariada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005, 295p.

MIRANDA, A.C.V. **Análise multivariada no agrupamento de bovinos da raça Senepol**. Seropédica: UFRRJ. 2014. 50p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2014.

MIRANDA, A.C.V.; JANGARELLI, M. Caracterização dos intervalos de ordem de parto de um rebanho de vacas leiteiras por meio da análise de componentes principais. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. Vitória, ES. 2014. **Anais...** Vitória: CBZ, 2014, p.1-3.

MORRISON, D.F. **Multivariate Statistical Methods**. 2.ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1976. 415p.

MUNIZ, C.A.S.D.; QUEIROZ, S.A; MASCIOLI, A.S.; ZADRA, L.E.F. Análise de componentes principais para características de crescimento em bovinos de corte. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p.1569-1576, 2014a.

MUNIZ, N.F.M.; FERRAZ FILHO, P.B.; SILVA, L.O.C.; BELLO, A.B.S.; SOUZA, J.C. Divergência genética entre touros da raça Gir. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.2, p.145-151, 2014b.

NOBRE, P.R.C.; MILAGRES, J.C.; SILVA, M.A. Fatores genéticos e de meio no período de lactação do rebanho leiteiro da Universidade Federal de Viçosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.13, n.3, p.375-384, 1984.

PEARSON, E.S.; HARTLEY, H.O. **Biometrika Tables for Statisticians**. 1.ed. Cambridge: University Press, New York, 1966.

PELICIONI, L.C.; MUNIZ, C.A.S.D.; QUEIROZ, S.A. Avaliação do desempenho ao primeiro parto de fêmea Nelore e F1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.4, p.729-734, 1999.

SAVEGNAGO, R.P. **Modelos de regressão aleatória, análise multivariada e redes neurais artificiais na avaliação genética da produção de leite de vacas holandesas**. Jaboticabal: UNESP. 2013. 114p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2013.

SANTOS, E.F.N. **Separação de grupos produtivos em bovinos leiteiros através de técnicas multivariadas**. Recife: UFRPE. 2009. 51p. Dissertação (Mestrado em Biometria e Estatística Aplicada) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 2009.

SANTOS, E.F.N.; SANTORO, K.R.; FERREIRA, R.L.C.; SANTOS, E.S.; SANTOS, G.R. Formation of productive genetic groups in dairy cows through principal components. **Revista Brasileira de Biometria**, v.28, n.3, p.15-22, 2010.

SANTOS, R. O Desempenho do Sindi na Índia e no Paquistão. In: SANTOS, R. **Sindi: O Gado Vermelho para os Trópicos** – Uberaba, MG. Editora Agropecuária Tropical, 2011, 596p.

SARTORIO, S.D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários usando o software R**. Piracicaba: ESALQ. 2008. 131p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), 2008.

SILVA, M.V.G.B.; BERGMANN, J.A.G.; MARTINEZ, M.L.; PEREIRA, C.S.; FERRAZ, J.B.S.; SILVA, H.C.M. Associação genética, fenotípica e de ambiente entre medidas de eficiência reprodutiva e produção de leite na raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.1115-1122, 1998.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.

SOARES, G.V.M.; RANGEL, A.H.N.; AGUIAR, E.M.; MEDEIROS, H.R.; LIMA JÚNIOR, D.M. Influência da ordem de parto sobre a produção de leite de vacas zebuínas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.2, p.106-110, 2009.

SOUZA, J.C.; SALLES, F.M.; SILVA, L.O.C.; MOTA, M.F.; FREITAS, J.A.; MALHADO, C.H.M.; FERRAZ FILHO, P.B. Avaliação de características produtivas em animais da raça Nelore por meio de análise multivariada. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.17, n.3/4, p.99-103, 2010.

TEODORO, R.L.; MARTINEZ, M.L.; VERNEQUE, R.S.; PIRES, M.F.A. Parâmetros genéticos e fatores de ajuste da produção de leite para o efeito de idade da vaca ao parto na raça Guzerá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2248-2252, 2000.

VAL, J.E.; FERRAUDO, A.S.; BEZERRA, L.A.F.; CORRADO, M.P.; LÔBO, R.B.; FREITAS, M.A.R.; PANETO, J.C.C. Alternativas para seleção de touros da raça Nelore considerando características múltiplas de importância econômica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.705-712, 2008.

VARAGO, F.C; MENDONÇA, L.F; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILVA, H.M.; PEREIRA, C.S. Aspectos fenotípicos da produção de leite e do período de lactação em vacas leiteiras com diferentes frações de sangue holandês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, n.6, p.465-475, 1989.

VICINI, L.; SOUZA, A.M. Análise do perfil do rebanho bovino nacional através da análise de componentes principais. In: XXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro Preto: ENEP, Ouro Preto, 2003, p.1-8.

VIEIRA, D.H.; MEDEIROS, L.F.D.; BARBOSA, C.G.; RODRIGUES, V.C.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, J.P. Efeitos não genéticos sobre as características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. II - Idade à primeira parição e intervalo de parto. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n.2, p.79-88, 2010.

XAVIER, L.H. **Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2000. 91p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2000.

WENCESLAU, A.A.; LOPES, P.S.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; EUCLYDES, R.F.; FERREIRA, W.J.; SILVA, M.A. Estimção de parâmetros genéticos de medidas de conformação, produção de leite e idade ao primeiro parto em vacas da raça Gir Leiteiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.153-158, 2000.

## CAPÍTULO II

---

### **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA SINDI**

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da doadora (até 6 anos vs. acima de 6 anos), estação do ano (chuvosa vs. seca), touro e tipo de sêmen (não-sexado vs. sexado) na produção *in vitro* de embriões da raça Sindi. Os dados foram fornecidos pelas empresas comerciais Sexing<sup>®</sup>, Tecgene<sup>®</sup> e Embryo<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil), referentes a 434 sessões de OPU realizadas entre o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2015 em 150 doadoras de oócitos procedentes de um criatório localizado no estado de São Paulo, sendo utilizados sêmen convencional e sexado de touros da mesma raça. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: oócitos recuperados, oócitos viáveis, oócitos degenerados, taxa de clivagem e taxa de blastocisto. Os dados foram analisados por ANOVA no procedimento GLIMMIX do SAS<sup>®</sup>. Foram recuperados um total de 11793 oócitos. Foram observado efeito do touro na taxa de blastocisto (P=0,02) e efeito da doadora na média de oócitos recuperados (P<0,001), proporção de oócitos viáveis (P=0,02), proporção de oócitos degenerados (P=0,02) e taxa de blastocisto (P<0,001), não sendo observado efeito do touro ou doadora na taxa de clivagem (P=0,94 e P=0,70, respectivamente). A estação do ano (chuvosa vs. seca) afetou a proporção de oócitos viáveis (67,80±0,00 vs. 64,00±0,01; P=0,02) e de oócitos degenerados (32,20±0,00 vs. 36,00±0,01; P=0,02). No entanto, a média de oócitos recuperados (23,40±1,21 vs. 24,00±1,43; P=0,43) e as taxas de clivagem (70,40±0,02 vs. 73,60±0,03; P=0,45) e blastocisto (26,80±0,01 vs. 26,70±0,01; P=0,95) não diferiram nas OPU realizadas em diferentes estações do ano. Com relação à idade da doadora no momento da OPU, aquelas com menos de seis anos tiveram maior média de oócitos recuperados (26,90±1,34 vs. 20,80±1,26; P=0,001), maior proporção de oócitos viáveis (68,50±0,01 vs. 64,40±0,01; P=0,01) e menor proporção de oócitos degenerados (31,50±0,01 vs. 35,60±0,01; P=0,01). Entretanto, não houve diferença nas taxas de clivagem (74,40±0,03 vs. 70,00±0,02; P=0,31) e de blastocisto (25,00±0,01 vs. 28,20±0,01; P=0,07) entre vacas mais jovens e mais velhas. O sêmen não-sexado gerou melhores taxas de clivagem (76,40±0,02 vs. 58,90±0,04; P=0,0005) e de blastocisto (27,50±0,01 vs. 23,10±0,01; P=0,02) do que o sêmen sexado. Portanto, pode-se concluir que doadoras de até seis anos de idade produzem maior número de oócitos recuperados e viáveis do que doadoras mais velhas. O sêmen não-sexado apresentou os melhores resultados em relação ao sexado. Fêmeas da raça Sindi produzem maior número de oócitos viáveis na época chuvosa, não se observando efeito da idade da doadora ou estação do ano sobre a produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** Aspiração folicular, *Bos indicus*, fertilização *in vitro*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the donor (up to 6 years vs. over 6 years), season of the year (rainy vs. dry), sire and type of semen (unsorted vs. sex-sorted) on *in vitro* production parameters of embryos in Sindhi breed. Data were provided by the commercial companies Sexing<sup>®</sup>, Tecgene<sup>®</sup> and Embryo<sup>®</sup> (São Paulo, Brazil), related to 434 OPU sessions held from January 2008 to January 2015 in 150 Sindhi oocyte donors raised on a farm located in the state of São Paulo, wherein the unsorted and sex-sorted semen from bulls of the same breed were used. Data were analyzed by ANOVA in the procedure GLIMMIX of SAS<sup>®</sup>. A total of 11793 oocytes were recovered. The effect of the sire on blastocyst rate ( $P=0.02$ ) and the effect of the donor on recovered oocytes average ( $P<0.001$ ), proportion of viable oocytes ( $P=0.02$ ), proportion of degenerated oocytes ( $P=0.02$ ) and blastocyst rate ( $P<0.001$ ) were observed, with no effect of sire or donor on cleavage rate ( $P=0.94$  and  $P=0.70$ , respectively). The season of the year (rainy vs. dry) affected the proportion of viable oocytes ( $67.8\pm 0.00$  vs.  $64.0\pm 0.01$ ;  $P=0.02$ ) and degenerated oocytes ( $32.2\pm 0.00$  vs.  $36.0\pm 0.01$ ;  $P=0.02$ ). However, the average of recovered oocytes ( $23.4\pm 1.21$  vs.  $24.0\pm 1.43$ ;  $P=0.43$ ) and cleavage ( $70.4\pm 0.02$  vs.  $73.6\pm 0.03$ ;  $P=0.45$ ) and blastocyst rates ( $26.8\pm 0.01$  vs.  $26.7\pm 0.01$ ;  $P=0.95$ ) did not differ in the OPU carried out in different seasons. Regarding the age of the donor at the time of OPU, those with less than 6 years old had higher average of recovered oocytes ( $26.9\pm 1.34$  vs.  $20.8\pm 1.26$ ;  $P=0.001$ ), higher proportion of oocytes viable ( $68.5\pm 0.01$  vs.  $64.4\pm 0.01$ ;  $P=0.01$ ) and lower proportion of degenerated oocytes ( $31.5\pm 0.01$  vs.  $35.6\pm 0.01$ ;  $P=0.01$ ). However, there was no difference in the cleavage ( $74.4\pm 0.03$  vs.  $70.0\pm 0.02$ ;  $P=0.31$ ) and blastocyst rates ( $25.0\pm 0.01$  vs.  $28.2\pm 0.01$ ;  $P=0.07$ ) between younger and older cows. The unsorted semen generated the best cleavage ( $76.4\pm 0.02$  vs.  $58.9\pm 0.04$ ;  $P=0.0005$ ) and blastocyst rates ( $27.5\pm 0.01$  vs.  $23.1\pm 0.01$ ;  $P=0.02$ ) than sex-sorted semen. Therefore, it can be concluded that donors with less than 6 years old produce a greater number of recovered and viable oocytes than older donors. The unsorted semen showed the best results regarding to sex-sorted one. Sindhi females can undergo OPU with more efficiency during the rainy season, and the effect of age or season of the year on *in vitro* production of embryos was not observed.

**Keywords:** *Bos indicus*, follicular aspiration, *in vitro* fertilization.

## 1 INTRODUÇÃO

A atual e crescente necessidade de incremento da produtividade pecuária tem conduzido a aplicação de várias biotécnicas de manejo reprodutivo, principalmente quanto à espécie bovina, que apresenta um baixo número de descendentes e longo intervalo de gerações. Neste sentido, a produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma ferramenta que vem sendo largamente utilizada no Brasil, proporcionando um aumento na possibilidade de multiplicação do material genético obtido de fêmeas bovinas, contribuindo de forma decisiva para melhorar a qualidade e a quantidade do produto final, seja este carne ou leite (GONÇALVES et al., 2007).

O principal objetivo da PIV consiste na obtenção de um maior número de embriões viáveis e, conseqüentemente, maior número de descendentes. Observa-se que, atualmente, esta técnica tem demonstrado maiores vantagens em relação à transferência de embriões convencional *in vivo* (TE) por apresentar maior flexibilidade, podendo ser utilizada em fêmeas nos diversos estágios fisiológicos e reprodutivos, dispensando a utilização de tratamentos hormonais para a recuperação dos oócitos. Apesar dessas vantagens, seu custo econômico ainda é maior em relação à TE, o que viabiliza sua utilização em escala comercial. Além disso, a fertilização *in vitro* de oócitos recuperados permite a utilização de touros diferentes para doadoras individuais, assim como viabiliza a utilização do sêmen sexado, sendo esta característica a que mais justifica a utilização da PIV (RATH & JOHNSON, 2008).

Existem diversos estudos sendo realizados com as raças zebuínas no Brasil com relação aos aspectos relacionados à PIV, seja a nível de produção comercial na tentativa de obter maior número de prenhez, e também a nível de pesquisa, seja na busca por novas descobertas sobre os processos que envolvem a PIV, tais como maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro*. De fato, os animais de genótipo *Bos indicus* se sobressaem em regiões de clima quente devido a sua melhor rusticidade e adaptabilidade, enquadrando-se nos diversos tipos de sistemas de produção que se encontram no país, apresentando desempenhos médios satisfatórios. Quanto estes animais são submetidos aos procedimentos PIV, normalmente se obtêm uma grande quantidade de estruturas viáveis, seja oócitos ou embriões.

A raça zebuína Sindi têm sido criada em algumas regiões no Brasil e utilizada principalmente para a produção de leite. No entanto, até o presente momento, foram realizados poucos trabalhos na tentativa de avaliar a eficiência desta produção. Pelo fato de serem animais conhecidos por sua reputação em rusticidade, os poucos trabalhos que tem sido realizados com a referida raça no país referem-se mais aos aspectos produtivos e de desenvolvimento ponderal, tais como avaliações da qualidade da carne e carcaça, comprimento da garupa, altura e perímetro torácico. Na região Nordeste, as instituições de pesquisa tem buscado estudar estes animais no aspecto de ambiência, realizando trabalhos que envolvem os processos de adaptação fisiológica e comportamental aos diferentes tipos de manejo, solo e clima, bem como na obtenção de melhores índices de tolerância ao calor.

Entretanto, estudos relacionados aos aspectos reprodutivos e utilização de biotécnicas são escassos na raça Sindi. Não foram relatados na literatura, até o presente momento, dados envolvendo a PIV comercial, bem como pesquisas demonstrando a quantidade média de oócitos e embriões produzidos *in vitro* por esta raça, sendo que estes dados poderiam ter uma grande importância para a maior exploração do potencial reprodutivo e produtivo destes animais. Portanto, os objetivos deste capítulo foram analisar os parâmetros de produção *in vitro* de embriões na raça Sindi em função dos fatores idade da doadora, estação do ano, touro e tipo de sêmen.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Conceito, Origem e Histórico da Produção *in vitro* de Embriões

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma importante biotécnica da reprodução animal que permite a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

Com relação à origem e histórico da PIV, pesquisadores interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram as primeiras pesquisas com a finalidade de estabelecer metodologias e procedimentos que permitissem a manipulação dos embriões. Desse modo, entre 1877 e 1879, foi observada pela primeira vez a fecundação de um oócito de estrela do mar com posterior formação da primeira célula do futuro embrião. Os invertebrados marinhos foram objeto das primeiras pesquisas porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea (ANDREOTI, 2007; GONÇALVES et al., 2008; SANTOS, 2010).

Nos mamíferos, somente no ano de 1929 surgiu o primeiro relato sobre a possibilidade de se cultivar embriões de coelhos desde os primeiros estádios de clivagem até o estágio de blastocisto, sendo que anos mais tarde, em 1959 obteve-se o nascimento do primeiro coelho gerado a partir dessa técnica, sendo originado de oócito fecundado *in vitro*. No final dos anos 70, vários outros relatos da obtenção de PIV seguida de nascimentos de filhotes saudáveis de camundongos e ratos foram registrados. Em 1977 foi relatada a maturação e fecundação *in vitro* de oócito bovino, e em 1978, na Inglaterra, estabeleceu-se um marco na história da PIV no mundo com o nascimento de Louise Brown, o primeiro bebê humano proveniente de um oócito fecundado *in vitro* (STEPTOE & EDWARDS, 1978; GARCIA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

Com relação aos animais de produção, apenas na década de 80 é que surgiram os primeiros relatos sobre MIV e FIV de oócitos bovinos. Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos, o que só foi possível graças às pesquisas iniciais desenvolvidas com animais de laboratório (BRACKETT et al., 1982). Ainda no final da década de 80, a PIV de embriões bovinos sofreu uma grande expansão, verificando-se que essa técnica poderia ser totalmente realizada sob condições artificiais, onde pôde ser verificado o processo completo de PIV em bovinos, com maturação e fecundação dos oócitos e desenvolvimento embrionário. Nessa mesma década, mas ainda sem grande repercussão, houve relatos de nascimento a partir de embriões PIV de outras espécies de ruminantes, como ovinos e caprinos (GONÇALVES et al., 2008; VARAGO et al., 2008).

No Brasil, a PIV de embriões bovinos teve início no ano de 1990 graças a aprovação de um projeto de inovação tecnológica financiado parcialmente pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões, localizadas no estado de São Paulo. Desse modo, os primeiros nascimentos a partir de PIV de embriões bovinos foram obtidos em 1994 utilizando oócitos imaturos, sêmen descongelado e sistemas de cultivo. Esta evolução tornou-se possível em função de diversos avanços realizados na definição de condições de cultivo apropriadas, sendo que atualmente, a PIV tem sido utilizada em larga escala comercialmente e por diversos laboratórios no país para pesquisa e multiplicação de material genético na produção animal (ALVES et al., 2003; RUMPF, 2007; BUENO & BELTRAN, 2008; SANTOS, 2010; ANDRADE et al., 2012).

## 2.2 Etapas da Produção *in vitro* de Embriões

A coleta de oócitos para a produção *in vitro* de embriões pode ser feita por diversas técnicas, sendo *post mortem*, a partir da punção folicular quando o número de ovários obtidos de abatedouro é reduzido, ou *in vivo* por meio da laparotomia ou de laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008). Há mais de uma década, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem apresentado uma maior flexibilidade e sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (BRACKETT & ZUELKE, 1993; BOLS et al., 2004; GONÇALVES et al., 2007; ANDRADE et al., 2012).

Sabe-se que a eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está relacionada à metodologia utilizada, e esta interfere na quantidade e morfologia dos complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) recuperados, e conseqüentemente, na competência para o desenvolvimento *in vitro*. Desse modo, tem se observado que a aspiração folicular duas vezes por semana produz uma maior porcentagem de embriões de melhor qualidade e um maior número de embriões transferíveis do que as aspirações realizadas semanalmente ou a cada 15 dias (GIBBONS et al., 1994; HASLER et al., 1995; LOONEY et al., 1994; DAYAN, 2001; GARCIA et al., 2004). Após a recuperação dos oócitos, os três processos biológicos subsequentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem as etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

A maturação envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que este possa ser fecundado e, posteriormente, possa se desenvolver até o estágio de blastocisto. Durante todo o seu desenvolvimento, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação nuclear teria início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, o que ocorreria naturalmente com a ovulação, e, *in vitro*, sabe-se que a retirada do oócito do contato com as células foliculares é o fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear. Desse modo, observa-se que a maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio de diplóteno da prófase (meiose I) até a fase de metáfase (meiose II) (LONERGAN et al., 1994; GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

Existem diversos sistemas de maturação para a PIV de embriões bovinos. Até os dias atuais, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados e já foram testados *in vitro* para a maturação dos oócitos, tais como o Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199<sup>®</sup>). Desses sistemas, o TCM199<sup>®</sup> é o mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 $\beta$ , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000). Além do meio, torna-se necessário a presença de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

Além da aquisição da maturação nuclear, torna-se necessário que os oócitos adquiram progressivamente a capacidade de completar a maturação citoplasmática e, dessa forma, possam suportar o desenvolvimento embrionário até a fase final do crescimento folicular (BLONDIN et al., 2002; LEQUARRE et al., 2005). Nesse contexto, a maturação citoplasmática consiste em diversas modificações ultra-estruturais, moleculares e bioquímicas do citoplasma e da membrana plasmática do oócito, que o permitem adquirir a competência para o desenvolvimento e o mecanismo enzimático relacionado ao bloqueio da polispermia.

Observa-se que a maioria dos oócitos coletados para PIV está incluso em pequenos folículos antrais e, apesar de competentes para o reinício da meiose, apresentam baixa capacitação para o desenvolvimento embrionário. Desse modo, essa capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido às estas transformações ocorridas no oócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002; HUMBLLOT et al., 2005; GONÇALVES et al., 2007).

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozóide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto. Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola do oviduto para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem à capacitação dos espermatozoides, onde se observam modificações bioquímicas, tais como alterações na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando em uma hiperativação espermática. Desse modo, esse processo torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde ocorre a reação acrossômica. Já no processo *in vitro*, para que ocorra todo esse processo, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPCÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

De acordo com alguns autores, o meio mais usado para a fecundação *in vitro* é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que contém em sua constituição agentes capazes de promover a capacitação espermática, como a heparina. Além deste, outros fatores importantes para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio de fecundação. Com relação ao co-cultivo (espermatozoide e oócito), este é realizado por um período que varia de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Para tanto, os espermatozoides vivos são adicionados nas gotas de fecundação contendo os oócitos em uma concentração final que pode variar de 1,0 a 5,0 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/mL de meio (IRITANI & NIWA, 1977; DAYAN, 2001; BUENO & BELTRAN, 2008).

Após as etapas de maturação e fecundação, e já tendo-se formado o zigoto, este deverá passar por inúmeras divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto ou embrião propriamente dito. No entanto, há um momento crítico para o desenvolvimento embrionário posterior, sendo que este se inicia logo após a fecundação, quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. Este momento crítico ocorre porque o embrião, em sua fase inicial de desenvolvimento, é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática, sendo que essa fase dura até a ativação do genoma embrionário, a qual ocorre, em bovinos, no estágio em que as estruturas embrionárias estão na fase de 8 a 16 células, e é conhecida como transição materno-zigótica (BLONDIN & SIRARD, 1995; MINAMI, 1996; BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001; CAMARGO et al., 2001; GONÇALVES et al., 2008).

Desse modo, com o passar dos anos, novos sistemas de cultivo foram sendo criados, testados e aperfeiçoados para permitirem o desenvolvimento embrionário *in vitro*, a partir de meios como o Whitten e o Brinster Medium for Ovum Culture (BMOC), e da utilização do co-cultivo de embriões com diversos outros tipos de células, tais como células epiteliais do oviduto bovino (CEOB), células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (*buffalo rat liver*), células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (GONÇALVES et al., 2007; BUENO & BELTRAN, 2008; VARAGO et al., 2008).

Segundo alguns autores, a contribuição das células somáticas aos sistemas de cultivo está na produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGF $\beta$ 1, que estimulam a proliferação de células e são importantes para a remoção de componentes inibitórios do ambiente de cultivo, que poderiam ser prejudiciais ao embrião. Entretanto, atualmente, esse sistema tem sido substituído por sistemas mais simples como Charles Rosenkrans (CR-1, CR-2), Synthetic Oviductal Fluid (SOF) e meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos e associados a uma atmosfera gasosa controlada contendo 5% de O<sub>2</sub>. Observa-se que esses sistemas têm inúmeras vantagens em termos de praticidade e economia, podendo ser utilizados em meios com baixa concentração de soro sanguíneo (LONERGAN et al., 1996; MATSUI et al., 1997; CAMARGO et al., 2001; BUENO & BELTRAN, 2008).

Semelhante aos processos de maturação e fertilização, o cultivo embrionário *in vitro* também requer um ambiente adequado, com tempo, atmosfera e temperatura controlados. Desse modo, o tempo de cultivo *in vitro* tem apresentado variação de 7 a 9 dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) e umidade saturada. Durante este processo, a taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia de cultivo, sendo que os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia para se avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

### **2.3 Efeito da Idade da Doadora sobre a Produção *in vitro* de Embriões**

Entende-se por senescência o processo progressivo e irreversível de envelhecimento, estando diretamente relacionada às disfunções associadas com a senilidade. Observa-se que a senescência reprodutiva varia individualmente e abrange todos os aspectos do declínio na esfera reprodutiva decorrentes da idade, sendo que nas fêmeas se manifesta por diminuição das células germinativas, perda completa da fertilidade e diminuição abrupta na circulação dos hormônios esteroides gonadais (ADAMS, 1984; PACKER et al., 1998; BROEKMANS et al., 2007; MALHI et al., 2008; FERREIRA, 2011).

Desse modo, de acordo com alguns autores, tem sido observado um declínio na contagem dos folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular, resposta ovariana aos tratamentos superestimulatórios reduzida, menor recuperação dos oócitos e consequentemente menor produção embrionária em fêmeas mais velhas em relação as mais jovens. Da mesma forma, fêmeas mais velhas tendem a ter um menor número de folículos maiores do que 9 mm após superestimulação ovariana com gonadotrofinas, apresentando mudanças no perfil hormonal e tamanho folicular em comparação com as fêmeas mais jovens (MALHI et al., 2005; RIZOS et al., 2005; MALHI et al., 2006; SU et al., 2012).

De acordo com Ferreira (2011), a causa para a perda dos oócitos devido à idade parece estar relacionado ao problema de não disjunção meiótica e ao acúmulo de danos no DNA com o avançar da idade. Nesse sentido, Erickson (1966), ao avaliar ovários de vacas da raça Holandesa retirados cirurgicamente por meio de coletas realizadas em abatedouro, encontrou folículos normais em vacas com idade acima de 10 anos, além da presença de folículos atresícos predominando em idades mais avançadas. Segundo este mesmo autor, foi observado que a perda folicular ovariana pode ocorrer entre 15 e 20 anos. Do mesmo modo, Peixoto et al. (2006) relatam a maturidade fisiológica ovariana pode ocorrer de 5 a 8 anos em bovinos.

Malhi et al. (2008), ao estudarem a dinâmica folicular ovariana e o perfil hormonal em fêmeas mais velhas em comparação com as mais jovens, observaram que as concentrações circulantes de FSH foram mais elevadas nas mais velhas, sendo que o recrutamento folicular (folículos de 2 a 3 mm) foi mantido em fêmeas mais velhas. No entanto, apesar das elevadas

concentrações de FSH, as mais velhas tiveram um menor número de folículos de 4 a 5 mm em cada onda folicular quando comparadas com as mais jovens. De acordo com estes autores, esta relação inversa entre o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular e as concentrações máximas de FSH podem estar relacionadas a um mecanismo compensatório, que justifica a produção folicular em fêmeas bovinas até uma determinada idade (MALHI et al., 2005). Além dessas observações, ainda no estudo de Malhi et al. (2008), o diâmetro do folículo ovulatório e do corpo lúteo de fêmeas mais velhas foram menores no momento da ovulação em comparação com as mais jovens, demonstrando o efeito da idade da doadora sobre a dinâmica de desenvolvimento folicular e ovulação.

Segundo dados da literatura, as taxas de fertilização e clivagem diminuem com o avançar da idade (MALHI et al., 2008; FERREIRA, 2011; SU et al., 2012). No mesmo estudo de Malhi et al. (2008), foi verificado um menor número de embriões e uma maior proporção de oócitos não-fertilizados e zigotos degenerados após superestimulação ovariana a partir de fêmeas mais velhas em comparação com as mais jovens, sendo que esta observação foi validada pelo fato de que o total de oócitos recuperados por doadoras mais velhas produziram menos de 50% dos embriões em relação às doadoras mais jovens. No entanto, apesar desses resultados, a sobrevivência dos embriões obtidos a partir de fêmeas mais velhas e mais jovens após a transferência destes para receptoras jovens não foram diferentes. Portanto, a gestação e as perdas embrionárias não diferiram entre fêmeas mais jovens e mais velhas.

De acordo com alguns autores, o início da queda da eficiência reprodutiva é caracterizado por mudanças no perfil hormonal, detectadas por alterações na dinâmica folicular ovariana (VOM SAAL et al., 1994). Desse modo, observa-se que altas concentrações plasmáticas de FSH e LH aumentam o estímulo ao desenvolvimento folicular, causando perda acelerada dos folículos. Assim, essas mudanças se refletem na baixa qualidade e capacidade dos folículos velhos em produzir concentrações adequadas de inibina, que exerceria efeito de retroalimentação negativa na secreção de FSH. Desse modo, sem a ação ou com a baixa atividade da inibina, as vacas mais velhas teriam maiores concentrações plasmáticas de FSH, o que causaria uma aceleração no processo de foliculogênese (CAETANO et al., 1997; FLAWS et al., 1997; PACKER et al., 1998; FERREIRA, 2011).

De acordo com Malhi et al. (2005; 2006; 2008), em fêmeas bovinas, o envelhecimento reprodutivo está associado com a elevação na concentração plasmática das gonadotrofinas FSH e LH e redução na concentração plasmática dos hormônios esteroides estrógeno (E2) e progesterona (P4). Observa-se que a redução no recrutamento folicular a cada onda folicular emergida indica uma possível redução na resposta ao FSH, o que desencadeia um desenvolvimento sempre mais lento dos folículos dominante e ovulatório, que atingem sempre um menor diâmetro no momento da ovulação.

De fato, relatos na literatura associando oócitos de qualidade inferior com animais mais velhos são bastante frequentes (DAYAN, 2001; RIZOS et al., 2005; PEIXOTO et al., 2006; MALHI et al., 2008). De fato, Mermillod et al. (1992), ao avaliarem os efeitos da idade na produção de blastocistos após a maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro*, observaram maior produção de embriões em animais entre 1 e 3 anos de idade do que em animais mais velhos. De acordo com Garcia et al. (1999) e Su et al. (2012), animais mais velhos produzem um menor número de oócitos e com baixo percentual de desenvolvimento, além da baixa qualidade devido ao menor número de camadas de células do *cumulus*, gerando oócitos menos competentes.

## 2.4 Efeito da Sazonalidade sobre a Produção *in vitro* de Embriões

Entre os diferentes fatores que interferem nos resultados da PIV de embriões bovinos, as condições climáticas, relacionadas diretamente com a estação do ano, podem ter importância relativa em regiões de clima tropical. Apesar disso, estas condições, na maioria das regiões brasileiras, favorecem os animais de genótipo *Bos taurus* devido a sua maior adaptabilidade às condições adversas de manejo e clima. Entretanto, poucos estudos têm sido feitos com o objetivo de demonstrar a maior tolerância das raças zebuínas ao estresse ambiental causado pelas altas temperaturas, com informações limitadas sobre a sua influência sobre os aspectos da PIV (FERNANDES et al., 2001; GAMA FILHO et al., 2007).

Sendo assim, as características ambientais agem diretamente sobre os rebanhos bovinos, refletindo-se nas suas características reprodutivas e produtivas. No Brasil, em certas regiões geográficas como a Sudeste e a Centro-Oeste, observam-se duas épocas distintas ao longo do ano, sendo uma chuvosa e outra seca, no verão e inverno, respectivamente. Desse modo, alterações na temperatura ambiental, umidade relativa do ar, pluviometria, tipo de solo e cobertura forrageira são aspectos importantes que devem ser levados em consideração, pois estes, em certas situações, podem limitar a eficiência produtiva e reprodutiva, com impactos diretos na PIV (PEIXOTO et al., 2006; FERREIRA, 2011; DOURADO et al., 2012).

Os principais efeitos da época do ano na produção e desenvolvimento de embriões *in vitro* referem-se tanto aos parâmetros climáticos quanto aos nutricionais. Estes efeitos são especificamente relativos à disponibilidade e qualidade dos alimentos, ocorrendo principalmente em sistemas de produção onde os animais são manejados a pasto, como é comumente observado na maior parte do território brasileiro (FERREIRA, 2011). Neste sentido, a fim de se verificar tais efeitos, Tribulo et al. (1991) realizaram um estudo para se avaliar o efeito da sazonalidade em vacas da raça Brahman mantidas a pasto, e observaram que as fêmeas produziram maior número de estruturas totais e fecundadas em coletas realizadas nos meses do verão quando comparadas com aquelas realizadas nos meses do inverno, sendo verificado, nesta estação do ano, menor número de oócitos viáveis e embriões por coleta. Do mesmo modo, em um trabalho realizado por Rubin et al. (2005) em doadoras da raça Nelore, os autores relataram que as fêmeas produziram maior proporção de oócitos viáveis na época da primavera e verão quando comparado com a época do outono e inverno.

Em um estudo realizado por Márquez et al. (2005), a estação do ano influenciou os resultados da produção de embriões após o tratamento superestimulatório em vacas da raça Gir, sendo que no verão e inverno as médias obtidas foram 3,5 e 2,7 embriões viáveis, respectivamente. No entanto, em um outro estudo realizado com doadoras da raça Nelore submetidas a bom manejo nutricional, não foi observado efeito da época do ano na coleta de embriões viáveis, sendo que as médias encontradas foram 11,0 e 9,8 para o verão e inverno, respectivamente (SOUZA et al., 2007). Lopes (2003) também não observou diferenças na produção de oócitos totais e viáveis a partir do tratamento superestimulatório de vacas da raça Gir não lactantes, entre as épocas de inverno e verão no estado do Rio de Janeiro. No entanto, neste estudo os manejos nutricionais foram semelhantes entre as duas estações, não sendo observada grande variação na temperatura ambiental entre as duas diferentes épocas do ano.

Rocha et al. (1998), ao realizarem um experimento com fêmeas *Bos taurus* (Holandesas) e *Bos indicus* (Brahman) submetidas a aspiração folicular durante a primavera/verão e outono/inverno, observaram que as fêmeas Holandesas apresentaram menor porcentagem de oócitos normais durante os meses da primavera e verão (24,5%) em relação aos meses do outono e inverno (80,0%) e menor porcentagem de oócitos fertilizados que atingiram o estágio de 8 células, sendo que nenhum embrião chegou ao estágio de mórula

ou blastocisto. No entanto, para as fêmeas da raça Brahman, não foi visto diferença na porcentagem de oócitos normais ou no desenvolvimento embrionário entre as estações do ano, concluindo que a alta temperatura e umidade ambiental durante o período do verão resultaram em declínio na qualidade embrionária a partir de oócitos obtidos de fêmeas da raça Holandesa, não se observando o mesmo efeito na raça Brahman, talvez pelo fato das mesmas serem mais resistentes aos danos provocados pelo aumento da temperatura ambiental.

De acordo com Zeron et al. (2001), efeitos do estresse calórico também afetam as propriedades ultra-estruturais, físicas e bioquímicas das membranas celulares, conferindo diferença na morfologia dos oócitos coletados no inverno em relação ao verão e, ainda, um maior teor de ácidos graxos saturados no verão e poli-insaturados no inverno. Além disso, segundo Sartori et al. (2002), os acréscimos na temperatura corporal comumente observados durante os meses mais quentes do ano provocam hipertermia e interferem com a produção de calor enógeno, tendo consequências adversas na função reprodutiva, reduzindo, assim, as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário. Isto está possivelmente relacionado ao fato de se prejudicar a capacidade esteroidogênica dos folículos e a dinâmica folicular ovariana, afetando-os no início do estágio antral de desenvolvimento e causando prejuízo no folículo subsequente, na função e na redução da dominância do folículo selecionado (GUZELOGLU et al., 2001; AL KATANANI et al., 2002; JU et al., 2005; CAMARGO et al., 2007).

## **2.5 Uso do Semen Sêxado na Produção *in vitro* de Embriões**

A utilização do sêmen sexado permite otimizar os indicadores de produtividade através do aumento da eficiência reprodutiva de bovinos de corte e leite, além de produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas de acordo com os interesses dos produtores, a fim de se obter vantagens das características que são limitadas ou influenciadas pelo sexo, e com isso facilitar as práticas de manejo reprodutivo. Além disso, permite a seleção de fêmeas potencialmente superiores, produzindo novilhas de repasse especificamente desses animais, (MOCÉ et al., 2006; RATH & JOHNSON, 2008; SILVA et al., 2015).

Sabse-se que a maior proporção de machos entre os embriões mamíferos produzidos *in vitro* com sêmen não-sexado pode limitar a aplicação da técnica de PIV, principalmente em rebanhos bovinos com aptidão leiteira, sendo que o uso do sêmen sexado pode reverter essa situação. Nesse sentido, essa inversão é benéfica quando as fêmeas possuem um maior valor de mercado do que os machos, como nas explorações econômicas voltadas para a produção de leite (RHEINGANTZ et al., 2004; RATH et al., 2009; SILVA, 2012). No entanto, o processo de sexagem espermática pode afetar algumas características estruturais do espermatozoide bovino, mas não elimina sua capacidade de gerar embriões *in vitro* (LU & SEIDEL, 2004; GARNER & SEIDEL, 2008; CARVALHO et al., 2010; ARRUDA et al., 2012).

Alguns estudos tem relatado baixas taxas de clivagem e blastocisto, enquanto outros não tem observado diferenças no desenvolvimento de blastocistos entre o sêmen sexado e não-sexado (LU & SEIDEL, 2004; CARVALHO et al., 2010; STINSHOFF et al., 2012). Essas diferenças podem ser devidas a vários fatores, tais como os métodos de seleção dos oócitos, qualidade do sêmen sexado ou tipo de cultivo. Além disso, diferenças individuais também tem sido observadas, mostrando que o sêmen de alguns touros pode ser mais negativamente afetado pelo processo de sexagem do que outros touros (LU & SEIDEL, 2004; BLONDIN et al., 2009; ARRUDA et al., 2012; SILVA, 2012; TRIGAL et al., 2012).

Sabe-se que nos processos *in vitro*, a adição da heparina ao meio de fertilização tem sido utilizada para capacitar espermatozoides bovinos. No entanto, observam-se que existem variações individuais entre touros quanto à concentração de heparina necessária para a

capacitação espermática. De acordo com Gonçalves et al. (2008), a concentração ideal de heparina varia de 2 a 100 µg/mL de meio, dependendo do touro e do processo de separação espermática. Apesar de haver uma variação na concentração de heparina, tem sido visto que a mais eficiente, nos diferentes processos e para os diferentes touros, está em torno de 10 µg/mL de meio (LU & SEIDEL, 2004; ARRUDA et al., 2012; SILVA, 2012). Lu & Seidel (2004) testaram o sêmen sexado de diferentes touros e observaram que diferentes concentrações de heparina foram necessárias para se obter uma boa capacitação. O sêmen sexado de alguns touros não se beneficiava da heparina como um reagente para se induzir à capacitação, indicando que as concentrações espermáticas efetivas do mesmo touro podem diferir entre o sêmen sexado e não-sexado. Além disso, fatores associados com o processo de sexagem talvez possam vir parcialmente capacitar o espermatozoide, gerando diferenças nas taxas de blastocisto entre touros individuais (PALMA et al., 2008; SILVA, 2012).

Lu & Seidel (2004) também demonstraram que maiores concentrações de heparina na PIV com o sêmen sexado poderiam aumentar a taxa de polispermia. Contudo, mesmo com altas concentrações de heparina, as taxas de polispermia foram menores quando comparadas com o sêmen não-sexado. Além disso, tem sido relatado que nos bovinos a taxa de polispermia é baixa, independente de se usar diferentes touros ou diferentes concentrações de heparina na PIV (BOUSQUET et al., 1999). Spinaci et al. (2006) demonstraram que o sêmen sexado não necessita de muitas outras condições de capacitação na PIV quando comparado com o sêmen não-sexado, e isto também poderia explicar a reduzida fertilidade observada *in vivo* quando as inseminações artificiais são feitas o mais próximo possível das ovulações. (BLONDIN et al., 2009; ARRUDA et al., 2012).

Além dessas diferenças, outras relacionadas aos procedimentos decorrentes do processo de sexagem, tais como menor gota de fertilização e a concentração de  $1,0 \times 10^6$  espermatozoides/mL, também foram requeridos para se obterem os melhores resultados. Neste contexto, a criopreservação de embriões também vem demonstrando um importante papel, sendo que o método de vitrificação funciona de forma bem melhor nos embriões produzidos *in vitro* (CRAN et al., 1995; XU et al., 2009; BARCELÓ-FIMBRES et al., 2011). De fato, Xu et al. (2006), ao produzirem embriões *in vitro* vitrificados em doadoras da raça Holandesa, observaram maiores taxas de clivagem e blastocisto com o uso do sêmen sexado, demonstrando uma possível alternativa aos danos causados pelo processo de sexagem.

Morton et al. (2007) realizaram estudos de expressão gênica e demonstraram que embriões derivados de sêmen sexado exibiram uma expressão diferencial de genes importantes no desenvolvimento celular. Em contraste, Carvalho et al. (2012) examinaram os perfis de metilação do DNA de alguns genes e não observaram alterações, embora variações individuais nos perfis entre os touros tenham sido detectadas. Do mesmo modo, Stinshoff et al. (2012) demonstraram que o processo de sexagem e o uso do sêmen sexado na PIV não influenciaram a qualidade embrionária precoce a nível molecular.

Portanto, independente da redução na integridade da membrana e na motilidade progressiva do sêmen sexado, não tem sido observada uma menor produção de embriões na PIV. Talvez a diminuição na motilidade e na porcentagem de células com membrana acrossomal intactas não seja um fator crítico para as condições *in vitro*, assim como o são para as condições *in vivo*. Contudo, embriões derivados de sêmen sexado apresentam uma alta proporção de danos nas membranas nucleares e uma falta no número de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso quando comparados com embriões derivados de sêmen não-sexado (PALMA et al., 2008). Este fato pode ser devido à fragmentação do DNA no espermatozoide de alguns touros, o que pode explicar porque alguns são mais adversamente afetados pelo processo de sexagem (GOSÁLVEZ et al., 2011; ARRUDA et al., 2012).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de Coleta dos Dados

Este capítulo foi desenvolvido utilizando-se a coleta de dados de produção *in vitro* (PIV) de embriões referentes às sessões de aspiração folicular (OPU) realizadas entre o período de 25 de Janeiro de 2008 a 15 de Janeiro de 2015. Esses dados foram fornecidos pelas empresas comerciais Sexing Technologies do Brasil<sup>®</sup> (Sertãozinho, São Paulo), Tecgene<sup>®</sup> e Embryo<sup>®</sup> (São José do Rio Preto, São Paulo) através de fichas individuais de FIV, sendo armazenadas em pastas no escritório das Fazendas Reunidas Castilho, localizada em Novo Horizonte, estado de São Paulo. As informações referentes à idade dos animais foram obtidas diretamente no endereço eletrônico da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), localizada em Uberaba, estado de Minas Gerais, através do link consulta pública de animais.

### 3.2 Organização do Banco de Dados

Após a concessão dos dados, os mesmos foram organizados e inseridos em uma planilha com o auxílio do Programa Microsoft Office Excel 2010<sup>®</sup> a fim de se estabelecer um banco de dados original. Este continha informações referentes ao número de sessões de OPU, nome da doadora, rebanho de origem, nome do touro, data de nascimento, ordem de parto, data da sessão de OPU, estação do ano, tipo de sêmen, partida de cada touro, oócitos recuperados, oócitos viáveis em graus I, II e III, oócitos degenerados em grau IV, taxa de aproveitamento de oócitos, número de oócitos maturados, número de embriões clivados, taxa de clivagem, número de embriões produzidos, taxa de blastocisto em D7, embriões transferidos, prenhez aos 30 dias, prenhez aos 60 dias e perdas de prenhez. No entanto, algumas dessas informações não puderam ser incluídas nas análises pela perda de um grande número de repetições.

Portanto, restaram as seguintes informações no banco de dados: identificação da doadora (por nome conforme as fichas individuais e posteriormente por número); idade da doadora (até 6 anos e acima de 6 anos); estação do ano no momento da OPU (chuvosa e seca); tipo de sêmen (não-sexado e sexado) e identificação do touro (por nome conforme as fichas e posteriormente por número) como fatores de interferência. Após estes fatores, seguiram-se as variáveis a serem explicadas: oócitos recuperados; oócitos viáveis em graus I, II e III; oócitos degenerados em grau IV; taxa de clivagem e taxa de blastocisto em D7. As repetições foram referentes ao número de sessões de OPU.

### 3.3 Animais e Manejo

Foram coletados dados referentes a 434 sessões OPU realizadas em 150 doadoras de oócitos da raça Sindí (*Bos indicus*), com idade variando de 2 a 24 anos, devidamente registradas na ABCZ, originárias de diferentes estados do Brasil e posteriormente criadas em rebanhos pertencentes às Fazenda Reunidas Castilho. Estas doadoras foram mantidas sob condições específicas de manejo e alimentação de acordo com a rotina de cada rebanho.

O grupo de doadoras continha novilhas, primíparas e múltíparas, que foram aspiradas em várias etapas de seus ciclos reprodutivos. Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e todas foram submetidas às avaliações ultrassonográficas no momento da OPU. As doadoras não foram submetidas a qualquer tipo de controle farmacológico do ciclo estral nem a tratamentos superovulatórios previamente às aspirações foliculares, sendo utilizadas apenas fêmeas livres de problemas reprodutivos e sem

nenhuma anomalia genital, com escore de condição corporal entre 3,5 e 4,5 (FERREIRA, 2010). As sessões de OPU foram realizadas por diferentes técnicos procedentes das empresas comerciais, que foram os responsáveis pela execução de todas as atividades.

### 3.4 Rotina das Aspirações Foliculares

As sessões de OPU não tiveram uma rotina específica de frequência de aspiração, sendo realizada em média uma sessão a cada 20 dias. Porém, em certos períodos de intervalo dos anos em estudo, em um ou mais meses, não foi observada nenhuma sessão de OPU nos rebanhos avaliados, e, do mesmo modo, em alguns meses, houve a realização de mais de uma sessão de OPU por semana. Cada fêmea foi aspirada em diferentes frequências, sendo registrado doadoras aspiradas de uma até 32 vezes durante o período avaliado.

### 3.5 Caracterização Climática da Região em Estudo

O clima da região do presente estudo (mesorregião de São José do Rio Preto e microrregião de Novo Horizonte, estado de São Paulo), é classificado como tropical úmido Aw segundo classificação de koppen-Geiger, caracterizando-se por ter todos os meses do ano com temperatura média mensal superior a 18°C, com forte precipitação anual e chuvas de verão. Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), a localização geográfica está situada a 21° 28' 05'' de latitude sul e 49° 13' 15'' de longitude oeste, com altitude de 447,00 metros, demonstrando médias das temperaturas mínimas e máximas de 18 e 30°C, e umidade relativa média variando de 37 a 82% (INMET, 2015).

Desse modo, a região apresenta uma estação quente e chuvosa, que normalmente abrange os meses de outubro a março (primavera e verão) e uma estação seca, que abrange os meses de abril a setembro (outono e inverno), onde se pode supor que as variações na temperatura, associadas às precipitações pluviométricas, podem exercer influência no desempenho reprodutivo e produtivo dos animais, principalmente naqueles criados a pasto. A Tabela 1 demonstra as médias das temperaturas mínimas, compensadas e máximas, umidades relativas do ar e precipitações pluviométricas registradas entre os anos de 2008 a 2015, na microrregião de Novo Horizonte, estado de São Paulo.

**Tabela 1.** Médias de temperaturas mínimas, compensadas e máximas, umidades relativas do ar e precipitações pluviométricas entre os anos de 2008 a 2015 em Novo Horizonte, SP.

Variáveis Climáticas	Estação Chuvosa	Estação Seca
Temperatura Mínima (°C)	20,24±1,01	16,60±1,63
Temperatura Média Compensada (°C)	24,84±0,90	21,87±1,52
Temperatura Máxima (°C)	30,58±1,22	28,31±1,96
Umidade Relativa do Ar (%)	71,63±6,02	60,42±9,95
Precipitação Pluviométrica Mensal (mm)	158,78±83,00	45,73±45,73

Fonte: INMET/BDMEP, 2015.

### 3.6 Parâmetros Avaliados

Foi avaliado o efeito da doadora (n = 152), idade da doadora (até 6 anos *versus* acima de 6 anos), estação do ano (chuvosa *versus* seca), touro (n = 22) e tipo de sêmen (não-sexado *versus* sexado) sobre os parâmetros de produção *in vitro* de embriões (variáveis). Estes foram

oócitos recuperados (média  $\pm$  erro padrão), oócitos viáveis em graus I, II e III (porcentagem  $\pm$  erro padrão), oócitos degenerados em grau IV (porcentagem  $\pm$  erro padrão), taxa de clivagem (porcentagem  $\pm$  erro padrão) e taxa de blastocisto em D7 (porcentagem  $\pm$  erro padrão).

Para se verificar o efeito da idade da doadora, as mesmas tiveram suas idades categorizadas em duas classes, de modo que uma classe abrangeu doadoras de até 6 anos de idade (2 a 6 anos - 52 doadoras) e a outra classe abrangeu doadoras acima de 6 anos de idade (7 a 24 anos - 98 doadoras). Do mesmo modo, para se verificar o efeito da estação do ano, consideraram-se as sessões de OPU separadas conforme o período do ano, sendo pertencentes à estação chuvosa as aspirações realizadas entre outubro a março (259 aspirações) e à estação seca as aspirações realizadas entre abril a setembro (175 aspirações).

Além disso, para se avaliar o efeito do tipo de sêmen, consideraram-se as sessões de OPU separadas conforme a procedência do sêmen que foi utilizado para as fertilizações *in vitro*, sendo analisado o uso do sêmen não-sexado ou sexado para o cromossomo X de 22 touros puros da raça Sindhi para a obtenção de fêmeas. Foram utilizadas diferentes partidas de cada touro (sêmen não-sexado e sexado). Adicionalmente, foram avaliados os efeitos individuais da doadora e do touro.

### 3.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os parâmetros de produção *in vitro* de embriões foram analisados pelo programa Statistical Analyses System 2000 (SAS<sup>®</sup>). O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 considerou-se que ocorreram diferenças significativas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

Para a análise estatística dos dados relacionados aos oócitos recuperados (total de oócitos coletados), oócitos viáveis em graus I, II e III (total de viáveis em relação aos recuperados), oócitos degenerados em grau IV (total de degenerados em relação aos recuperados), taxa de clivagem (total de clivados em relação aos viáveis) e taxa de blastocisto em D7 (total de embriões em relação aos viáveis), foi realizada a análise de variância (ANOVA) no procedimento GLIMMIX do SAS<sup>®</sup> (GLM – Least Squares Means), sendo considerados os efeitos da doadora e do touro, idade da doadora, estação do ano e tipo de sêmen, conforme demonstrado abaixo:

CowID AgeC Season Semen Sire = OR pOV pOD pCleared pBtD7; em que:

CowID: efeito da doadora;

AgeC: efeito da idade da doadora;

Season: efeito da estação do ano;

Semen: efeito do tipo de semen;

Sire: efeito do touro;

OR: média de oócitos recuperados;

pOV: porcentagem de oócitos viáveis em graus I, II e III;

pOD: porcentagem de oócitos degenerados em graus IV;

pCleared: porcentagem de embriões clivados; e

pBtD7: porcentagem de blastocistos em D7.

Desse modo, os oócitos recuperados, oócitos viáveis em graus I, II e III, oócitos degenerados em grau IV, taxa de clivagem e taxa de blastocisto em D7 foram as variáveis dependentes, sendo que a doadora, touro, idade da doadora, estação do ano e tipo de sêmen foram as variáveis independentes do modelo (Tests of Hypotheses for Mixed Model Analysis of Variance).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção *in vitro* de Embriões na raça Sindi (*Bos indicus*)

As 434 sessões de aspiração folicular (OPU) das 150 doadoras de oócitos da raça Sindi geraram no total 11793 oócitos recuperados, dos quais 7972 foram considerados viáveis, resultando em 2820 embriões que chegaram até o estágio de blastocisto em D7. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados gerais da PIV de embriões das Fazendas Reunidas Castilho.

**Tabela 2.** Oócitos recuperados, oócitos viáveis, oócitos degenerados, embriões clivados e blastocistos na raça Sindi. Números total, mínimo, máximo, média e coeficientes de variação.

Parâmetros	Total	Mínimo	Máximo	Média	CV
Oócitos recuperados	11793	2	139	27,17±19,88	55,82%
Oócitos viáveis	7972	0	86	18,37±14,11	22,25%
Oócitos degenerados	3821	0	53	8,80±7,50	43,72%
Embriões clivados	5336	0	42	12,33±9,93	49,90%
Embriões blastocistos	2820	0	32	6,50±5,44	66,10%

CV=Coefficiente de Variação.

Existem vários trabalhos na literatura relacionados a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em diversas raças zebuínas sobre diferentes condições de manejo e alimentação no Brasil, tais como Nelore, Guzera e Gir. No entanto, são escassos os trabalhos realizados com a raça zebuína Sindi, talvez pelo menor número de animais em rebanhos existentes no Brasil, relacionado à falta de conhecimento e divulgação da raça por parte da comunidade científica e comercial. Desse modo, os resultados que serão apresentados neste capítulo e nos posteriores são inéditos e, conseqüentemente, pioneiros para a raça Sindi.

De acordo com os resultados obtidos de demais raças zebuínas, tem sido observada uma grande variabilidade na produção de oócitos e embriões *in vitro* (GALLI et al., 2003; LOPES et al., 2006; BARUSELLI et al., 2007; HIRATA et al., 2008; PONTES et al., 2009; FERREIRA, 2011; SILVA et al., 2015), tal como foi verificado no presente estudo. Animais de genótipo *Bos indicus* têm apresentado médias de 18 a 25 oócitos recuperados por sessão de OPU (WATANABE et al., 1999; VIANA et al., 2010; SILVA et al., 2015). No entanto, a média de oócitos recuperados no presente estudo foi de 27 estruturas (Tabela 2), embora a literatura cite que em doadoras zebuínas é destaque a alta produção oocitária (SILVA, 2009).

Pontes et al. (2011), ao avaliarem 317 sessões de OPU em doadoras da raça Nelore, observaram média de 30,84±0,88 oócitos recuperados por sessão de OPU, dos quais 23,35±0,72 foram considerados viáveis. Do mesmo modo, Pontes et al. (2009), ao avaliarem as sessões de OPU em doadoras da mesma raça, obtiveram média de 25,60±15,30 oócitos viáveis. Do mesmo modo, Watanabe et al. (1999) relataram média de 18,00±4,90 oócitos recuperados por sessão de OPU, indicando uma grande variabilidade na média de oócitos recuperados e viáveis encontrados nos diferentes estudo.

Com relação as doadoras da raça Gir, existem vários trabalhos relatados na literatura. Grázia et al. (2012) observaram média de 16,30±1,00 e 10,6±0,70 oócitos recuperados e viáveis por sessão de OPU e Viana et al. (2010) observaram média de 7,00±0,10 oócitos recuperados por sessão de OPU. Do mesmo modo, Silva et al. (2015), ao avaliarem 500 sessões de OPU, obtiveram média de oócitos recuperados e viáveis de 15,57±11,9 e 9,12±7,97, ao passo que Ferreira (2011), ao avaliar 363 sessões de OPU em 83 doadoras da

mesma Gir, relatou média de  $16,77 \pm 10,67$  oócitos viáveis, sendo que houve uma grande variação, com doadoras produzindo até 56 oócitos viáveis por sessão de OPU.

Seneda (2010) relata a ocorrência de centenas de estruturas obtidas por sessão de OPU em doadoras zebuínas. De fato, no presente estudo, observaram-se doadoras que produziram até 139 oócitos recuperados por sessão de OPU, dos quais 86 foram considerados viáveis. Isto pode estar relacionado ao fato de que a quantidade de oócitos produzidos pode apresentar variações devido a diferentes condições experimentais de manejo, alimentação e clima. Além disso, o fator individual também pode estar associado a estes achados, visto que duas doadoras do presente estudo foram aspiradas 22 e 32 vezes cada durante o período de avaliação, o que pode ter contribuído para os resultados gerais do presente estudo (Tabela 2).

A produção *in vitro* de embriões também apresenta variações entre raças e diferentes estudos (TAMASSIA et al., 2003; MACHADO et al., 2006; RATTO et al., 2011). Pontes et al. (2009) obtiveram média de  $9,40 \pm 5,30$  embriões na raça Nelore, e Pontes et al. (2010) obtiveram média de  $3,20 \pm 0,01$  embriões na raça Gir. A média de embriões obtida no presente estudo com a raça Sindi ( $6,50 \pm 7,00$ ) encontrou-se próxima a relatada na literatura para doadoras *Bos indicus*. Semelhante a produção de oócitos, a produção de embriões demonstrou grande variação, obtendo-se até 32 estruturas por sessão de OPU (Tabela 2).

#### 4.2 Efeito da Idade da doadora na Produção *in vitro* de Embriões

Houve efeito da idade da doadora no número médio de oócitos recuperados ( $P=0,001$ ), porcentagem de oócitos viáveis e porcentagem de oócitos degenerados ( $P=0,01$ ) por sessão de OPU. As taxas de clivagem ( $P=0,31$ ) e de blastocisto em D7 ( $P=0,07$ ) não foram influenciadas pelas categorias de idade, conforme Tabela 3.

**Tabela 3.** Médias de estruturas recuperadas, porcentagem de oócitos viáveis e degenerados, e taxas de clivagem e blastocisto em D7 de acordo com a idade da doadora.

Parâmetros	2 a 6 Anos	7 a 24 Anos	Valor de P	CV
Oócitos recuperados	$26,90 \pm 1,34$	$20,80 \pm 1,26$	0,001*	86,60%
Oócitos viáveis	$68,50 \pm 0,01$	$64,40 \pm 0,01$	0,01*	23,94%
Oócitos degenerados	$31,50 \pm 0,01$	$35,60 \pm 0,01$	0,01*	47,00%
Taxa de clivagem	$74,40 \pm 0,03$	$70,00 \pm 0,02$	0,31	39,00%
Taxa de blastocisto	$25,00 \pm 0,01$	$28,20 \pm 0,01$	0,07	66,62%

CV=Coefficiente de Variação.

\*Valores de P significativos ( $P < 0,05$ ).

Os estudos encontrados na literatura têm demonstrado o efeito da idade da doadora sobre os parâmetros de produção *in vitro* de embriões, sendo que os resultados indicam uma maior produção por fêmeas mais jovens em relação as fêmeas mais velhas (MERMILLOD et al., 1992; RIZOS et al., 2005; MALHI et al., 2008; FERREIRA, 2011; SU et al., 2012; FERREIRA et al., 2014). No entanto, não foi observado efeito da idade da doadora sobre a produção *in vitro* de embriões na raça Sindi (Tabela 3).

Su et al. (2012) avaliaram os efeitos da idade da doadora na capacidade de aquisição da competência e no perfil hormonal em doadoras *Bos taurus* x *Bos indicus*. Os autores dividiram as doadoras em três categorias de idade (12 meses, 7 a 8 anos e de 8 a 15 anos) e as submetem as sessões de OPU, nos quais os oócitos foram coletados por 10 dias consecutivos a intervalos de 4 dias, sendo posteriormente maturados, fertilizados e cultivados

para a produção de embriões *in vitro*. Neste estudo, foi observado que as taxas de clivagem e blastocisto foram maiores ( $P < 0,05$ ) para as fêmeas mais jovens (12 meses) do que para as fêmeas mais velhas (7 a 8 anos e de 8 a 15 anos), sendo que as concentrações plasmáticas de estradiol foram mais altas e as concentrações plasmáticas de progesterona foram mais baixas antes e durante as sessões de OPU nas fêmeas mais jovens quando em comparação com as fêmeas mais velhas ( $P < 0,01$ ). Desse modo, os autores sugeriram que a idade da doadora poderia afetar a capacidade de desenvolvimento de oócitos recuperados por sessões de OPU através da ação dos hormônios esteróides sobre o desenvolvimento folicular.

No presente estudo, a produção de oócitos foi influenciada pela idade da doadora (Tabela 3). Isto pode estar relacionado aos efeitos deletérios do envelhecimento sobre a dinâmica folicular, sendo que fêmeas mais jovens podem ter recrutado maior número de folículos por onda de crescimento folicular. Apesar disso, não foram observadas diferenças nas taxas de clivagem e blastocisto em D7. De acordo com Seneda et al. (2002), fêmeas com baixo escore de condição corporal são doadoras de oócitos menos competentes para o desenvolvimento *in vitro*. No presente estudo, as doadoras apresentaram bom escore de condição corporal no momento das sessões de OPU, o que pode ter contribuído para que não houvesse diferença na produção de embriões.

Ferreira et al. (2014) avaliaram o efeito da idade da doadora sobre os parâmetros de produção *in vitro* de embriões em 363 sessões de OPU realizadas em 85 doadoras da raça Gir. Os autores dividiram as doadoras em três categorias de idade (2 a 6 anos, 7 a 10 anos e acima de 10 anos). Neste estudo, o número médio de oócitos viáveis foi influenciado pela idade da doadora, sendo maior na categoria de 2 a 6 anos ( $23,80 \pm 1,40$ ) em relação as demais categorias ( $18,90 \pm 1,10$  e  $14,00 \pm 1,60$ ,  $P < 0,05$ ), registrando-se uma queda de 0,9 estruturas por ano de idade. Do mesmo modo, com relação aos embriões, o estudo revelou maior produção por sessão de OPU na categoria de 2 a 6 anos ( $9,10 \pm 1,50$ ) em relação as demais categorias ( $7,10 \pm 1,50$  e  $4,10 \pm 1,60$ ,  $P < 0,05$ ). Muitos dos estudos que demonstrado o efeito da idade sobre a produção de oócitos também tem revelado o mesmo efeito sobre a produção de embriões *in vitro*, o que não foi observado no presente estudo.

De acordo com Malhi et al. (2008), fêmeas mais velhas produzem menor número de embriões e maior proporção de oócitos não fertilizados e zigotos degenerados em relação a fêmeas mais jovens. De fato, a proporção de oócitos degenerados encontrada no presente estudo foi maior para doadoras mais velhas. Malhi et al. (2005; 2007) relatam que fêmeas mais velhas podem apresentar menor número de receptores ou menor sensibilidade ao FSH pelas células foliculares, resultando em menor quantidade de folículos sendo recrutados a cada onda de crescimento folicular. Além disso, estes autores também comentam que pode haver uma demora na liberação do pico pré-ovulatório de LH, resultando no processo de envelhecimento folicular. Apesar de não terem sido avaliadas essas características no presente estudo, estes dados apontam para o efeito da idade da doadora sobre os parâmetros PIV.

Peixoto et al. (2006) avaliaram informações de doadoras das raças Gir, Guzerá e Nelore e relataram que o número máximo de embriões viáveis foi observado em doadoras entre 7 e 8 anos de idade. De fato, Callensen et al. (1996) argumentam que a maturidade ovariana em fêmeas bovinas ocorre entre 5 e 8 anos. No presente estudo, a média de idade das doadoras foi de 13 anos, onde não se observou efeito sobre a produção de embriões. Apesar disso, torna-se questionável a manutenção destas fêmeas em programas PIV, visto que poderiam acarretar prejuízos ao sistema de produção. Hasler et al. (1981) abordaram as desvantagens da manutenção de fêmeas além da idade que normalmente seriam descartadas em seus rebanhos, sendo que essa prática pode ter consequências negativas para a eficiência dos programas PIV, uma vez que a superioridade genética de doadoras mais jovens pode se

traduzir em populações sob seleção genética.

A literatura não relata estudos sobre o efeito da idade da doadora nos parâmetros de produção *in vitro* de embriões na raça Sindi. No entanto, e de acordo com os resultados do presente estudo, poderão ser utilizadas doadoras de diferentes idades na PIV desde que sejam submetidas a programas de seleção para a produção de oócitos viáveis, o que geraria o melhor aproveitamento das mesmas para a produção *in vitro* de embriões, visto que não houve efeito da idade da doadora nas taxas de clivagem e blastocisto em D7, conforme Tabela 3.

### 4.3 Efeito da Sazonalidade na Produção *in vitro* de Embriões

Houve efeito da sazonalidade na porcentagem de oócitos viáveis e porcentagem de oócitos degenerados ( $P=0,02$ ) por sessão de OPU. O número médio de oócitos recuperados ( $P=0,74$ ), e as taxas de clivagem ( $P=0,45$ ) e de blastocisto em D7 ( $P=0,95$ ) não foram influenciadas pela sazonalidade, conforme Tabela 4.

**Tabela 4.** Médias de estruturas recuperadas, porcentagem de oócitos viáveis e degenerados, e taxas de clivagem e blastocisto em D7 de acordo com a estação do ano.

Parâmetros	Chuvosa	Seca	Valor de P	CV
Oócitos recuperados	23,40±1,21	24,00±1,43	0,74	87,55%
Oócitos viáveis	67,80±0,00	64,00±0,01	0,02*	24,00%
Oócitos degenerados	32,20±0,00	36,00±0,01	0,02*	47,07%
Taxa de clivagem	70,40±0,02	73,62±0,03	0,45	39,01%
Taxa de blastocisto	26,80±0,01	26,70±0,01	0,95	66,89%

CV=Coefficiente de Variação.

\*Valores de P significativos ( $P<0,05$ ).

Os estudos relacionados aos efeitos da sazonalidade sobre a produção *in vitro* de embriões em doadoras zebuínas tem sido conduzidos com as raças Nelore e Gir (MÁRQUEZ et al., 2005; CAMARGO et al., 2007), não sendo observados na raça Sindi. No presente estudo, foi verificado influência positiva da estação chuvosa sobre a produção de oócitos (Tabela 4). Apesar da alta temperatura ambiental que é observada durante a referida estação, pois envolve os meses de outubro a março na região Sudeste, observa-se, adicionalmente, maior precipitação pluviométrica, sendo que esta exerce efeito benéfico sobre a disponibilidade de alimentos, aumentando a qualidade das pastagens tropicais. Dessa maneira, durante este período, as fêmeas apresentam melhores condições nutricionais, fazendo com produzam maior número de oócitos ao serem submetidas aos procedimentos PIV.

No presente estudo, foi observada maior proporção de oócitos degenerados na estação seca em comparação com a estação chuvosa (Tabela 4). Durante a estação seca na região Sudeste, apesar da menor temperatura ambiental, a precipitação pluviométrica é menor, o que contribuiu para a baixa qualidade das pastagens e maior estresse nutricional nas doadoras, já que estas foram alimentadas basicamente a pasto durante o período de avaliação. Apesar desse efeito, não foram observadas diferenças nas taxas de clivagem e blastocisto em D7 entre as estações do ano (Tabela 4), indicando que fêmeas da raça Sindi podem ser utilizadas para a produção de *in vitro* de embriões, independente da época do ano.

Ferreira (2011) avaliou o efeito das estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) em doadoras da raça Gir submetidas as sessões de OPU e observou que não houve influência da época do ano no número médio de oócitos viáveis ( $25,21±3,18$ ,  $15,43±2,45$ ,

15,76±2,12 e 19,98±3,45, P<0,05), porém verificou-se influência na produção de embriões (11,02±2,95, 8,12±2,09, 5,61±4,36 e 8,51±3,26, P<0,05), sendo que as maiores produções ocorreram entre a primavera e verão e início do inverno. Segundo o autor, estes resultados podem indicar um efeito do clima e nutrição sobre a conversão de oócitos a embriões e sobrevivência embrionária nas receptoras, por razões relacionadas ao próprio embrião ou às receptoras. No presente estudo, não foi avaliada a taxa de prenhez, estando os resultados relacionados a influência do clima e nutrição no desempenho das doadoras.

Dayan (2001) avaliou o efeito das estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) na produção *in vitro* de embriões realizada em 566 doadoras das raças Nelore e Gir submetidas a 841 sessões de OPU. O autor observou que no inverno a média de produção de oócitos foi superior ao outono (15,22±3,62 e 13,36±3,48, P<0,05), no entanto, a média de produção de embriões foi maior no verão e outono (4,35±2,38 e 4,14±2,49, P<0,05) e menor no inverno e primavera (3,46±2,31 e 3,83±2,54, P<0,05). Embora a produção de oócitos tenha sido maior no outono e inverno, a quantidade de embriões transferidos no inverno e primavera foi inferior ao restante do ano. Fatores como fotoperíodo, nutrição e temperatura podem influenciar a quantidade e a morfologia dos oócitos obtidos por sessão de OPU, visto que estes fatores podem interferir no metabolismo das doadoras. No estudo de Dayan (2001), a diminuição no resultado final da produção de embriões nos meses de outono e inverno pode ser atribuída a fatores como a temperatura externa no momento das sessões de OPU e a manipulação dos oócitos na fazenda.

Rocha et al. (1998) avaliaram os efeitos da temperatura e umidade relativa do ar sobre a qualidade oocitária em doadoras da raça Brahman submetidas a sessões de OPU durante as estações chuvosa e seca. Os autores não observaram diferença na porcentagem de oócitos viáveis (77,00±6,30 e 83,30±17,40, P=0,71) e na porcentagem de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto (41,30±7,20 e 52,30±13,50, P>0,58) entre as referidas estações. Esta capacidade de produzir embriões em boa qualidade durante a estação chuvosa pelas fêmeas Brahman pode ser devido a sua habilidade em manter a temperatura corporal dentro dos limites fisiológicos, mesmo durante os períodos de alta temperatura ambiental (HAMMOND et al., 1996). Estes autores também ressaltam que as doadoras Brahman se encontravam com boa condição corporal no momento das sessões de OPU, o que pode ter contribuído para esses resultados.

Pereira (2012) avaliou os parâmetros de produção *in vitro* de embriões em doadoras das raças Nelore e Gir submetidas a 2309 sessões de OPU durante os diferentes meses do ano. A autora observou grande variabilidade, sendo que os meses de maior produção oocitária foram aqueles correspondentes à estação chuvosa. Isto pode ter sido relacionado às variações nas condições climáticas durante os diferentes meses do ano, que pode incidir sobre a disponibilidade e a qualidade das forragens (CARRIJO, 2003; FLORENTINO, 2011; PEREIRA, 2012). A diminuição do fotoperíodo, associada à redução da temperatura e umidade relativa do ar, tem efeitos diretos, inicialmente sobre a qualidade e, posteriormente, sobre a disponibilidade dos nutrientes nas pastagens. No estudo de Pereira (2012), o sistema de manejo dos animais foi o semi-confinamento, e a melhor qualidade das pastagens na época do verão pode ter conduzido a este resultado. No presente estudo, as doadoras foram alimentadas a pasto, evidenciando o mesmo efeito sobre a produção de oócitos.

No presente estudo, não foi mensurada diretamente as variações estacionais sobre as características das pastagens. Apesar disso, esse efeito é bem descrito na literatura para as pastagens tropicais, sendo que o manejo comumente empregado para doadoras zebuínas é dependente da obtenção dos nutrientes das pastagens, estando sujeita a grandes variações, pois a suplementação com alimentos volumosos e concentrados é menos intensa. Portanto, as

doadoras avaliadas no presente estudo possivelmente foram submetidas aos efeitos da sazonalidade sobre a produção das forragens. Isto poderia explicar o fato da maior proporção de oócitos viáveis observada durante a estação chuvosa (Tabela 4), pois as forragens tropicais, nos meses de maior temperatura ambiental, apresentam aumento na digestibilidade dos seus nutrientes, o que contribui para um melhor desempenho na alimentação dos animais.

Gama Filho et al. (2007), ao avaliarem os efeitos da estação do ano sobre o desenvolvimento embrionário inicial em doadoras da raça Guzerá, verificaram efeito sazonal, observando interferência na porcentagem de embriões viáveis entre verão e inverno (41,20 e 90,00,  $P < 0,05$ ). As condições de estresse calórico severo e moderado foram atingidas no pico destas estações na microrregião de baixada, ao norte do estado do Rio de Janeiro. Os autores acreditam que os embriões oriundos de fêmeas da raça Guzerá foram termorresistentes ao índice de temperatura e umidade do verão e aos maiores picos de temperatura corporal, apesar de ter sido verificada maior porcentagem de oócitos degenerados no verão. De acordo com Peixoto et al. (2006), o período do ano em que são realizadas as sessões de OPU pode ser um dos fatores que influenciam a produção oocitária, tal como foi verificado no presente estudo.

A análise retrospectiva de dados meteorológicos possibilitou a identificação de duas épocas bem distintas na microrregião de Novo Horizonte, estado de São Paulo, com grandes variações nas temperaturas, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica entre as estações chuvosa e seca (Tabela 1,  $P < 0,05$ ). Essa caracterização climática, associada às flutuações na produção e qualidade das forragens, pode ter contribuído para o efeito sazonal na produção de oócitos observada no presente estudo, com maior porcentagem na época chuvosa. No entanto, não foi observado o mesmo efeito na produção de embriões (Tabela 4).

De acordo com Colombo et al. (2014), o período do ano tem efeito significativo quando, em determinado momento, os animais passam por necessidades nutricionais, prejudicando o seu desempenho reprodutivo. Fernandes et al. (2001) verificaram efeito das estações do chuvosa e seca sobre o número médio de oócitos viáveis em doadoras da raça Nelore na região de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul. Os autores observaram que a porcentagem de oócitos viáveis sobre o total de oócitos recuperados variou significativamente entre as estações chuvosa e seca (35,60 e 19,60,  $P < 0,01$ ), indicando que importantes modificações na função ovariana, com base na produção e qualidade dos oócitos, podem ser estimadas entre as estações do ano. Com base nas observações de Fernandes et al. (2001), a estação chuvosa torna-se mais favorável para a implantação de programas reprodutivos em rebanhos comerciais da raça Nelore.

A literatura não relata estudos sobre o efeito da estação do ano nos parâmetros de produção *in vitro* de embriões na raça Sindi. No entanto, e de acordo com os resultados do presente estudo, poderão ser utilizadas doadoras em diferentes estações, indicando o melhor aproveitamento das mesmas para a produção *in vitro* de embriões, visto que não houve efeito da sazonalidade nas taxas de clivagem e blastocisto em D7. A técnica da OPU, associada a maturação e fertilização *in vitro*, pode representar uma boa alternativa para se aumentar a performance reprodutiva de fêmeas dessa raça, e a recuperação de oócitos durante os diversos meses do ano pode se constituir em uma ferramenta importante para a produção de embriões e manutenção dos programas PIV em áreas subtropicais.

#### **4.4 Efeito do Touro e do Tipo de Sêmen na Produção *in vitro* de Embriões**

Houve efeito do touro na taxa de blastocisto em D7 ( $P = 0,02$ ), não sendo observado efeito na taxa de clivagem ( $P = 0,94$ ). Do mesmo modo, houve efeito do tipo de sêmen nas taxas de clivagem ( $P = 0,005$ ) e blastocisto em D7 ( $P = 0,02$ ), conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Taxas de clivagem e blastocisto em D7 de doadoras da raça Sindi fertilizadas com sêmen não-sexado ou sexado de touros da mesma raça.

Parâmetros	Não-sexado	Sexado	Valor de P	CV
Taxa de clivagem	76,42±0,02	58,89±0,04	0,005*	37,78%
Taxa de blastocisto	27,50±0,01	23,13±0,01	0,02*	66,10%

CV=Coefficiente de Variação.

\*Valores de P significativos (P<0,05).

Os dados relatados na literatura tem demonstrado que as taxas de clivagem e blastocisto utilizando-se oócitos viáveis e maturados *in vitro* são tipicamente mais baixas quando da utilização do sêmen sexado (MERTON et al., 2003; IMAI et al., 2006; MATOBA et al., 2014). De fato, no presente estudo observaram-se menores taxas de clivagem e blastocisto em D7 com o uso do sêmen sexado em comparação com o sêmen não-sexado (Tabela 5), e o efeito do touro, com grande variação entre os mesmos (SARTORI et al., 2004; SEIDEL & SCHENK, 2008; MERTON et al., 2009; SALES et al., 2011; SÁ FILHO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Morotti et al. (2014) observaram efeito do touro e do tipo de sêmen nas taxas de blastocisto (P<0,05) ao utilizarem oócitos obtidos de sessões de OPU em fêmeas das raças Nelore e Gir fertilizados com sêmen sexado e não-sexado obtidos de três touros Holandeses. Os autores obtiveram taxas de blastocisto em D7 de 34,00 e 50,00; 15,00 e 35,00 e 34,00 e 41,00 para os touros 1, 2 e 3 utilizando-se sêmen sexado e não-sexado, sendo maiores com o sêmen não-sexado. Este fato pode estar relacionado aos possíveis danos provocados pelo processo de sexagem às células espermáticas. Além disso, os autores observaram que as taxas de blastocisto em D7 variaram de 16,00 a 38,00% dependendo do touro utilizado.

Trigal et al. (2012) verificaram efeito individual do touro, assim como do tipo de sêmen, nas taxas de blastocisto em D7 e D8, sendo menores com o sêmen sexado em comparação com o não-sexado. Os autores observaram que o sêmen não-sexado dos touros 1, 2, 3, 4 e 5 gerou diferentes taxas de blastocisto em D8 (17,10±3,50; 8,60±2,10; 18,20±3,30; 16,50±3,70 e 6,20±2,20; P,05). Além disso, ao avaliarem as taxas de blastocisto em D8 com o uso do sêmen sexado desses mesmos touros, essas foram menores em comparação com o sêmen não-sexado (8,60±3,30; 4,90±1,90; 10,00±3,10; 8,50±3,30 e 0,00; P<0,05), evidenciando o efeito do touro para ambos os tipos de sêmen. Ainda neste estudo, as taxas de blastocisto em D7 com o sêmen não-sexado foram maiores em comparação com o sêmen sexado (29,30±1,70 e 11,90±1,80; P<0,001), tal como observado no presente estudo.

Os estudos relatados na literatura têm demonstrado uma grande variabilidade no desenvolvimento de embriões *in vitro*, sendo que uma parte dessa variação pode ser devida a diferentes touros, com diferentes capacitações para a produção de embriões (GALLI et al., 2003; PALMA & SINOWATZ, 2004). Pontes et al. (2010) observaram efeito do touro utilizando sêmen sexado de oito diferentes touros da raça Gir (P<0,05), sendo que as taxas de clivagem variaram de 57,00 a 84,00% e de blastocisto variaram de 13,00 a 50,00%. De fato, Seidel Jr. (2012) argumentou que é provável que os espermatozoides de alguns touros capacitem mais prontamente *in vitro* que os espermatozoides de outros touros. Com relação aos danos causados pelo processo de sexagem, convém destacar que os espermatozoides de alguns touros podem ser mais mais sensíveis aos danos do que outros touros, o que poderia explicar tais diferenças (BLONDIN et al., 2009; ARRUDA et al., 2012).

Ferreira (2011) obteve taxa de conversão de oócito a embrião de 41,70%, o que permite validar o uso desta técnica na raça Gir. No entanto, foi verificada diferenças entre

touros na taxa de prenhez e na conversão de oócito a embrião, com os resultados mostrando conversão atingida por vários touros acima da média relatada na literatura para sexagem realizada pelo processo de citometria de fluxo. Xu et al. (2009) acompanharam o desenvolvimento de embriões fertilizados com sêmen sexado de nove diferentes touros, e observaram que os embriões fertilizados por três touros demonstraram maiores taxas de blastocisto (20,00 a 30,00%) em relação aos outros seis touros (0,70 a 2,10%;  $P < 0,05$ ). Do mesmo modo, Palma & Sinowatz (2004), ao utilizarem sêmen de 63 touros da raça Simental na fertilização e produção *in vitro* de embriões, observaram grande variação devida ao touro nas taxas de clivagem (36,30 a 93,40%) e de blastocisto (6,90 a 51,52%). No entanto, os estudos relacionados ao efeito do touro sobre a PIV ainda precisam ser mais elucidados devido a variações que podem ocorrer entre laboratórios, técnicos e manejo.

No presente estudo, foram observadas diferenças nas taxas de clivagem e blastocisto em D7 entre os dois tipos de sêmen (Tabela 5), sendo que não foi possível avaliar as taxas de prenhez devido ao menor número de repetições para esta variável. Além disso, foi observado efeito individual, sendo que o sêmen sexado e não-sexado de 22 diferentes touros gerou diferentes porcentagens de embriões clivados e de blastocistos em D7. Adicionalmente, isto pode estar relacionado ao fato de terem sido utilizadas diferentes partidas de cada touro. Apesar dos resultados com o sêmen sexado terem sido inferiores em relação ao sêmen não-sexado, este tipo de sêmen tem sido bastante utilizado na produção *in vitro* de embriões devido ao seu maior retorno econômico para os sistemas de produção que priorizam a maior obtenção de machos para a produção de carne ou de fêmeas para a produção de leite, o que torna viável a sua aplicação em escala comercial.

#### 4.5 Efeito da Doadora na Produção *in vitro* de Embriões

Houve efeito da doadora na média de oócitos recuperados ( $P < 0,001$ ), proporção de oócitos viáveis ( $P = 0,02$ ), proporção de oócitos degenerados ( $P = 0,02$ ) e taxa de blastocisto ( $P < 0,001$ ), não sendo observado efeito na taxa de clivagem ( $P = 0,70$ ). De fato, os dados relatados na literatura tem demonstrado que a doadora pode exercer efeito particular sobre os parâmetros de produção *in vitro* de embriões, tal como foi observado no presente estudo. O fator individual tem sido apontado como de grande importância na competência dos oócitos para o desenvolvimento, apesar das variações pertinentes a idade, sazonalidade e escore de condição corporal (BOLS et al., 1997; WATANABE et al., 1999; SENEDA et al., 2002; MURASAWA et al., 2005; CUSHMAN et al., 2009; FERREIRA, 2011).

Tamassia et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência da doadora na produção *in vitro* de embriões em fêmeas da raça Holandesa. Os autores submeteram seis vacas procedentes da mesma propriedade a sessões de OPU por 42 semanas organizadas em quatro séries. Neste estudo, foi observada média de  $4,50 \pm 0,10$  oócitos recuperados por sessão de OPU, evidenciando grande variação individual ( $P < 0,05$ ). As taxas de blastocisto variaram entre os animais ( $28,80 \pm 1,80$ ,  $P < 0,05$ ), não se observando efeito nas taxas de clivagem ( $79,20 \pm 1,60$ ,  $P > 0,05$ ). Desse modo, os autores verificaram que a doadora influenciou os parâmetros de PIV. Ainda neste estudo, a melhor fêmea doadora de oócitos foi a mesma fêmea em todas as séries, e nenhuma correlação foi observada entre produção de oócitos e produção de embriões, indicando que são fatores independentes em bovinos.

Hasler et al. (1995) relataram uma grande variabilidade no número de oócitos e na taxa de blastocisto entre doadoras. Do mesmo modo, Boni et al. (1997) observaram grande variação no recrutamento folicular entre as fêmeas após vários meses de sessões de OPU, indicando que a variação na quantidade de oócitos obtidos entre as mesmas pode estar

diretamente relacionada as variações no recrutamento folicular, e isso torna possível indentificar fêmeas com diferentes fenótipos para a produção de oócitos. Apesar de não ter sido realizada a contagem dos folículos antrais e o acompanhamento da dinâmica folicular no presente estudo, é provável que as doadoras possuíam número variado de folículos no momento da OPU, visto que as mesmas foram aspiradas em momentos aleatórios do ciclo estral por não terem sido submetidas a protocolos hormonais, além de estarem sujeitas a sessões de OPU com diferentes frequências de aspiração.

Ireland et al. (2008), utilizando fêmeas bovinas para o estudo da contagem de folículos antrais, evidenciaram alta repetibilidade (0,85 a 0,95) no número de folículos entre as fêmeas por várias ondas foliculares consecutivas, independentemente da raça, idade, estação do ano ou condições de manejo. Estes autores observaram algumas fêmeas mostrando apenas oito folículos em crescimento durante ondas foliculares consecutivas de vários ciclos estrais, enquanto outras tinham aproximadamente 56 folículos em crescimento, repetidamente. Burns et al. (2005) relataram alta repetibilidade na contagem dos folículos antrais, com grande variabilidade entre as doadoras no número de folículos detectados por ultrassonografia, podendo ser realizada a referida contagem em estágio aleatório do ciclo estral. Desse modo, torna-se possível fenotipar as doadoras de forma confiável com base na contagem dos folículos durante as ondas foliculares (TAMASSIA et al., 2003; CUSHMAN et al., 2009).

De acordo com Kruip et al. (1994), o número de oócitos recuperados de uma mesma fêmea não varia entre as sessões de OPU, sendo que existe um recrutamento constante de novos folículos antrais quando os mesmos são aspirados, porém com variação individual na velocidade deste recrutamento. Dayan et al. (2000) verificaram grande variação na produção de oócitos e embriões *in vitro* em vinte fêmeas, sendo que a produção de blastocistos variou entre 14,00 e 54,00%, indicando que, na mesma doadora, podem ocorrer variações na produção de oócitos recuperados, oócitos viáveis e embriões. De fato, no presente estudo, as doadoras que produziram maior número de oócitos recuperados, oócitos viáveis e embriões por sessão de OPU foram as mesmas em cada sessão, o que enfatiza a repetibilidade na contagem dos folículos antrais entre as fêmeas, com efeito direto na PIV de embriões.

Ferreira (2011) observou grande variação entre doadoras da raça Gir no número de oócitos recuperados por OPU, obtendo de uma a 57 estruturas. Com relação ao número de folículos antrais presentes nos ovários, apesar de ser influenciado pelo padrão de crescimento e regressão dos folículos dominantes, sua principal fonte de variação é o padrão individual de recrutamento folicular, particularmente durante o período correspondente a primeira onda de crescimento folicular, visto que a população folicular total varia ao longo do ciclo estral, o que pode influenciar o número máximo de folículos aspirados. Silva (2009), avaliando a reserva folicular nos ovários de fêmeas das raças Nelore e Angus, relatou que o número de folículos antrais variou entre doadoras e dentro da mesma categoria, bem como entre raças, demonstrando diferenças na produção de oócitos.

Não foram relatados estudos com a raça Sindi. A produção *in vitro* de embriões na referida raça não é de larga escala como nas demais raças zebuínas, sendo que outros fatores relacionados a essa biotécnica necessitam ser mais elucidados. A melhor avaliação destes fatores pode contribuir para se compreender melhor todos os procedimentos envolvidos na PIV, o que poderá viabilizar sua aplicação em rebanhos da raça Sindi.

## 5 CONCLUSÕES

Doadoras de 2 a 6 anos produziram maior número médio de oócitos recuperados e maior proporção de oócitos viáveis por sessão de OPU.

Doadoras produziram maior proporção de oócitos viáveis por sessão de OPU durante a estação chuvosa.

O sêmen não-sexado apresentou os melhores resultados em relação ao sêmen sexado, e houve efeito individual na PIV de embriões.

A produção de embriões não foi influenciada pela idade da doadora e estação do ano.

## **6 CONCLUSÕES GERAIS**

O rebanho nacional da raça Sindi é caracterizado por fêmeas com diversidade genética, com diferentes grupos produtivos utilizados em sistemas de produção de leite.

A raça Sindi apresenta potencial para a produção *in vitro* de embriões, com fêmeas podendo ser geradas com a utilização de sêmen sexado em sistemas de produção de leite.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.E. Reproductive senescence In: AUSTIN, C.R.; SHORT, C.R. **Reproduction in Mammals**. 2.ed London. Cambridge University Press. 315p. (Book 4 Reproductive Fitness), 1984.
- AL-KATANANI, Y.M.; PAULA LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.390-396, 2002.
- ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, L.F.; BERNARDI, M.L.; DEZEN, D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.279-286, 2003.
- ANDRADE, G.A.; FERNANDES, M.A.; KNYCHALA, R.M.; PEREIRA JUNIOR, M.V.; OLIVEIRA, A.J.; NUNES, D.P.; BONATO, G.L.; SANTOS, R.M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- ANDREOTI, M. **Produção in vitro de embriões bovinos: uso da glutatona durante o processo de lavagem e capacitação espermática**. Belém: 2007. 45p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal do Pará (UFP), 2007.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, S.A.F.; AFFONSO, J.F. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.345-353, 2012.
- ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; HAIPECK, K.; LIMA, A.L.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V.P.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.3, p.149-156, 2002.
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; SEIDEL Jr., G.E. *In vitro* fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.495-502, 2011.
- BARUSELLI, P.S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, LU.; SALES, J.N.S.; AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.374-381, 2007.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, v.41, p.54-62, 1995.

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

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

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

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

BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.

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.

BRACKETT, R.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.

BROEKMANS, F.J.; KNAUFF, E.A.H.; TE VELDE, E.R.; MACKLON, N.S.; FAUSER, B.C. Female reproductive ageing current knowledge and future trends. **Endocrinology and Metabolism**, v.18, n.2, p.58-65, 2007.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.

BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.54-62, 2005.

- CAETANO, J.P.J.; FARIA, M.M.L.; LIMA, R.S.B.C. **Ginecologia e obstetrícia: Manual prático**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997, 726p.
- CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T.; GREVE, T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.205-214, 1996.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.1, 2001.
- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v.68, p.626-632, 2007.
- CARRIJO, L.D.H. Efeito da nutrição na eficiência reprodutiva de fêmeas de corte. In: I WORKSHOP DE PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE. **Anais... WPRBC: Goiânia**, 2013.
- CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.74, p.1521-1530, 2010.
- CARVALHO, J.O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; SARTORI, R.; RODRIGUES, F.C, BRAVIM, O.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development**, v.79, p.77-84, 2012.
- COLOMBO, A.H.B.; ZANIBONI, L.; CAVALIERI, F.L.B.; RIGOLON, L.P.; SEKO, M.; AZUMA, V.; SANTOS, J.M.G. Efeito do período e do número de animais na taxa de prenhez de receptoras submetidas à transferência de embriões provenientes da produção *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.7, n.1, p.11-19, 2014.
- CRAN, D.G.; JOHNSON, L.A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, v.136, p.495-496, 1995.
- CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.; FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1971-1980, 2009.
- DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.181-185, 2000.

DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. 2001. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.

DOURADO, A.P.; TORRES FILHO, R.A.; CARDOSO, E.C.; SINEDINO, L.D.P.; GERHARDT, B.T.; GOULARD, I.L.; NOGUEIRA, L.A.G. Produção estacional de embriões *in vivo* em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) na região sudeste (clima tropical), Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, n.3, p.183-189, 2012.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, n.3, p.800-805, 1966.

FERNANDES, C.E.; DODE, M.A.N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.3, p.131-135, 2001.

FERREIRA, A.M. **Reprodução da fêmea bovina: Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1.ed. Juiz de Fora, MG: Editar Editora Associada, 2010; 422p.

FERREIRA, M.B.D. **Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*)**. Jaboticabal: 2011. 176f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2011.

FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; SOUZA, J.C.; PINTO, T.L.C.; LIMA, M.R.; LEMOS, F.O.; FERNANDES, L.O.; GARCIA, J.M. Produção *in vitro* de embriões e prenhez de doadoras da raça Gir (*Bos Taurus indicus*): influência da idade da vaca e do touro. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.273, 2014.

FLAWS, J.A.; ABBUD, R.; MANN, R.J.; NILSON, J.H.; HIRSHFIELD, A.N. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 57, p.1233-1237, 1997.

FLORENTINO, C.M. **Fatores que influenciam no sucesso da produção *in vitro* de embriões em receptoras bovinas criadas na região da Amazônia legal**. 2011. 84f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 2011.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GAMA FILHO, R.V.; FONSECA, F.A.; UENO, V.G., FONTES, R.S.; QUIRINO, C.R.; RAMOS, J.L.G. Sazonalidade na dinâmica folicular ovariana e produção embrionária em novilhas da raça Guzerá. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.422-427, 2007.

GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, p.395-401, 2000.

GARCIA, J.M.; ESPER, C.R.; AVELINO, K.B.; PUELKER, R.Z.; VANTINI, R., ALMEIDA Jr., I.; RODRIGUES, C.F.M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, n.1, p.237, 1999. (Abstract).

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. Londrina, PR. **Anais...** SIRAA: Londrina, p.223-230, 2004.

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

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

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.B.; 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, n.2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

GOSÁLVEZ, J.; RAMIREZ, M.A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; EVANS, K.M.; KJELLAND, M.E.; MORENO, J.F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. **Theriogenology**, v.75, p.197-205, 2011.

GRÁZIA, J.G.V.; TAVARES, L.L.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M. Eficiência na produção *in vitro* de embriões mestiços F1 utilizando doadoras das raças Gir (*Bos taurus indicus*) ou Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.405, 2012.

GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J.D.; KASSA, T.; DIAZ, T.; THATCHER, M.J.; THATCHER, W.W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.15-34, 2001.

HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; CHASE Jr., C.C.; BOWERS, E.J.; RANDEL, R.D.; MURPHY, C.N.; VOGT, D.W.; TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **Journal of Animal Science**, v.74, p.295-303, 1996.

HASLER, J.F.; BROOKE, G.P.; MCCAULEY, A. D. The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. **Theriogenology**, v.12, p.109, 1981. (Abstract).

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.151-152, 1995.

HIRATA, T.I.; SATO, M.; SASAKI, A.I.; SASAKI, O.; OSAWA, T. Effect of suckling on embryo production by repeated ovum pick-up before and after timed artificial insemination in early postpartum Japanese black cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, p.351-364, 2008.

HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A.S.; JOLY, C.G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.

IMAI, K.; TAGAWA, M.; YOSHIOKA, H.; MATOBA, S.; NARITA, M.; INABA, Y.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, S. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.19-29, 2006.

INMET, 2015. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa - BDMEP**. Relatório de Dados Históricos. Brasília, DF. Brasil. Dados não publicados.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219-1225, 2008.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p.119-121, 1977.

JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1677-1689, 2005.

KRUIP, A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; BIES-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v.63, p.841-59, 2005.

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

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1420-1429, 1996.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v.41 p.62-72, 1994.

LOPES, B.C. **Comportamento sexual e concentração de progesterona de fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*) em diferentes estações climáticas após: I – Luteólise natural ou induzida, e II – superovulação.** 2003. 237f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2003.

LOPES, A.S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.196-203, 2006.

LU, K.H.; SEIDEL Jr., G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v.62, p.818-830, 2004.

MACHADO, S.A.; REICHENBACH, H.D.; WEPPERT, M.; WOLF, E.; GONCALVES, P.B. The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**, v.65, p.573-83, 2006.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, v.73, p.45-53, 2005.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; SINGH, J. Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v.66, p.1257-1266, 2006.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; SINGH, J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. **Reproduction**, v.134, p.233-239, 2007.

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

MÁRQUEZ, Y.C.; GALINA, C.S.; MORENO, N.T.L. Seasonal effect on Zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.553-558, 2005.

MATOBA, S.; YOSHIOKA, H.; MATSUDA, H.; SUGIMURA, S.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; HASHIYADA, Y.; SETA, T.; NAKAGAWA, K.; LONERGAN, P.; IMAI, K. Optimizing production of *in vivo*-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for *in vitro* production of embryos using X-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.743-753, 2014.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, v.48, p.605-616, 1997.

MERMILLOD, P.; WILS, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.717-723, 1992.

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

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

MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.361-369, 1996.

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

MOROTTI, F.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; SIQUEIRA, E.R.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus* and *Bos Taurus* cattle. **Theriogenology**, v.81, p.696-701, 2014.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.931-940, 2007.

MURASAWA, M., TAKAHASHI, T.; NISHIMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p.689-693, 2005.

PACKER, C.; TATAR, M.; COLLINS, A. Reproductive cessation in female mammals. **Nature**, v. 392, p.807-811, 1998.

PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomy, Histology, Embryology**, v.33, p.257-262, 2004.

PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMÜLLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. **Anatomy, Histology, Embryology**, v.37, p.67-73, 2008.

PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M; PEREIRA, C.S. Effect of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.567-574, 2006.

PEREIRA, A. **Variações climáticas ao longo do ano e resultados da PIVE em doadoras de diferentes grupos genéticos**. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, 2012.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nellore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-699, 2009.

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

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nellore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.

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

RATH, D.; MOENCH-TEGEDER, G.; TAYLOR, U.; JOHNSON, L.A. Improved quality of sex sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. **Theriogenology**, v.71, p.22-29, 2009.

RATTO, M.H.; PERALTA, O.A.; MOGOLLON, G.; STROBEL, P.; CORREA, J. Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.1-6, 2011.

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, A.M.P.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por *swim-up* ou gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.32-39, 2004.

- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.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 & Development**, v.61, p.234-248, 2002.
- RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEEB, J.F.; O'FARRELL, K.J.; MASIURTA, M.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.63, p.939-949, 2005.
- 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, p.657-665, 1998.
- RUBIN, K.C.P.; MAX, M.C.; PONTES, J.H.F. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça Nelore. **Acta Science Veterinariae**, v.33, p.372, 2005. (Resumo).
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.229-233, 2007.
- SÁ FILHO, M.F.; NICHI, M.; SOARES, J.G.; VIEIRA, L.M.; MELO, L.F.; ROJAS, A.O.; CAMPOS FILHO, E.P.; GAMEIRO, A.H.; SARTORI, E.; BARUSELLI, P.S. Uso do semen sexado em programas de inseminação artificial e transferência de embriões em bovinos. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.103-111, 2014.
- SALES, J.N.S.; NEVES, K.A.L.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; FARIA, M.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.76, p.427-435, 2011.
- SANTOS, K.J.G. **Efeito da progesterona exógena na produção de embriões em novilhas Gir e Girolando**. Goiânia: 2010. 124p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás (UFG), 2010.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2803-2812, 2002.
- SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, N.J.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIGER, L.N.; SCHENK, J.L.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, p.86-90, 2004.
- SEIDEL Jr., G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.129-138, 2008.

SEIDEL Jr., G.E. Diversas abordagens sobre a avaliação de sêmen. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.221-224, 2012.

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

SENEDA, M.M. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO APLICADA. Londrina, PR. **Anais...** SIRAA: Londrina, p.14-22, 2010.

SILVA, K.C.F. **Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***. Londrina: 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, 2009.

SILVA, A.P.T.B. **Efeito da raça da doadora e do touro (Holandesa e Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos**. Seropédica: 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2012.

SILVA, A.P.T.B.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês *versus* Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v.72, n.1, p.51-58, 2015.

SMETANINA, I.G.; TATARINOVA, L.V.; KRIVOKHARDCHENKO, A.S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Ontogenez**, v.31, p.139-143, 2000.

SOUZA, J.A.T.; MACEDO, N.A.; CARTER, J.A. Eficiência de doadoras e receptoras de embriões segundo a época do ano, a categoria e genótipo das receptoras. **Acta Science Veterinariae**, v.35, p.1235, 2007. (Resumo).

SPINACI, M.; VOLPE, S.; BERNADINI, C.; DE AMBROGI, M.; TAMANINI, C.; SEREN, E.; GALEATI, G. Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and Hsp90 in boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, p.899-907, 2006.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM – SAS. **SAS/STAT™. SAS user's guide for windows environment**. Version 6.11. Cary: 2000.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

STINSHOFF, H.; KRIENKE, M.; EKHLASI-HUNDRIESERA, M.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; FRESE, D.; RATH, D.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.78, p.132-139, 2012.

SU, L.; YANG, S.; HE, X.; LI, X.; MA, J.; WANG, Y.; PRESICCE, G.A.; JI, W. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.184-189, 2012.

TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, J.P.; MAILLARD, S.C. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.629-637, 2003.

TRIBULO, H.; BO, G.A.; JOFRE, F. Effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.35, p.286, 1991. (Resumo).

TRIGAL, B.; GOMEZ, E.; CAAMANO, J.N.; MUNOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTIN, D.; DIEZ, D. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.78, p.1465-1475, 2012.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

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

VOM SAAL, F.S.; FINCH, C.E.; NELSON, J.M. **Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates**. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The Physiology of Reproduction. 2.ed. New York: Raven Press, v.2, p.1213-1214, 1994.

XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYÉS, A.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2510-2518, 2006.

XU, J.; CHAUBAL, S.A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v.71, p.39-47, 2009.

WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.438, 1999. (Abstract).

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, n.1, p.94-100, 1993.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O. 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.