

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO

**Efeito da Raça da Doadora e do Touro (Holandesa e Gir)
na Produção *in Vitro* de Embriões Bovinos**

Ana Paula Toledo Barbosa da Silva

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**EFEITO DA RAÇA DA DOADORA E DO TOURO (HOLANDESA E
GIR) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

ANA PAULA TOLEDO BARBOSA DA SILVA

Sob a orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal

Seropédica, RJ
Agosto de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ANA PAULA TOLEDO BARBOSA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/----- (Data da defesa)

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Ângelo José Burla Dias. Dr. UENF
(Membro)

Vera Lúcia Teixeira de Jesus. Dra. UFRRJ
(Membro)

A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.
(Alice no País das Maravilhas)
Lewis Carroll

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Barbosa da Silva e
Genilda Maria de Toledo Silva;

Aos meus irmãos Paulo José e Paulo Vitor e à
toda minha família e amigos;

Em especial ao meu “Dear” orientador Marco
Roberto Bourg de Mello.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as coisas boas que vivi, por que sei que o bem apenas dele é que veio.

Aos meus pais José Barbosa da Silva e Genilda Maria de Toledo Silva, pelo imenso apoio para a realização do mestrado. Também pelo amor, carinho, compreensão, preocupação e por todos os momentos de atenção e de alegria, sem os quais eu não poderia de modo algum completar toda esta jornada.

Ao professor e orientador deste trabalho, Marco Roberto Bourg de Mello, pela confiança, dedicação, amizade e por me proporcionar um aprendizado fundamental o qual levarei para toda minha vida.

Às amigas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ, Valéria da Silva Ferreira e Raquel Rodrigues da Costa Mello, pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos, incentivos e por me acolherem sempre que precisava de um ombro amigo, além de ajudarem na elaboração da dissertação.

Aos amigos Joaquim Esquerdo Ferreira (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ) e Leandro Mendes Mascarenhas (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ) pela amizade, conselhos, incentivos e pelas conversas sobre reprodução.

Aos amigos do Setor de Reprodução Animal da UFRRJ: Alan César Ferreira Dias, Wagner Pereira Martins, Bernardo Janella Ferreira da Silva, Sávio de Oliveira Paiva, Beatriz de Oliveira Cardoso, Jéssica Machado Cardoso, Rebecca Barbosa, e aos estagiários do professor Júlio César Ferraz Jacob, pela amizade aqui construída, pelos momentos de risadas, conselhos e aprendizado.

Às amigadas aqui construídas, principalmente Sandra Helena Carvalho, Natália Muricy, Thais Oliveira, Flávia Martins, Alessandra Fortes e Adriana Fortes. Obrigada meninas pela força, vocês foram muito importantes nessa fase da minha vida, nunca esquecerei de vocês.

Aos mestres que tive ao longo desta jornada em especial à professora Michelle Tancredi pelo estímulo, pelos conselhos, pelo exemplo e pelo apoio profissional.

Aos professores e aos funcionários do Setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, em especial ao professor José Eugênio Três, ao professor Júlio César Ferraz Jacob e à professora Vera Lúcia Teixeira de Jesus pela contribuição e convívio durante todo este período. À professora Vera Lúcia Teixeira de Jesus agradeço ainda pela ajuda na dissertação, pelo apoio profissional e, principalmente, por me dar uma oportunidade de estágio o qual resultou no mestrado, agradeço imensamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realização do curso; ao coordenador do Programa, professor Paulo de Tarso Landgraff Botteon, pela

análise estatística dos resultados, e às secretárias Lorena Florêncio e Dona Regina pelo comprometimento aos alunos.

À empresa *In Vitro*-Rio pela disponibilização dos dados e instalações para a realização do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. A todos os meus mestres e amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho. A todos estes eu dedico este meu trabalho de dissertação.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

SILVA, Ana Paula Toledo Barbosa. **Efeito da raça da doadora e do touro (Holandesa e Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Clínica). Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Dentre os vários fatores que interferem na eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIV), a raça da doadora de oócitos e a do reprodutor são os de maior importância. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da raça da doadora de oócitos e a raça do touro (Holandesa e Gir) sobre a PIV de embriões bovinos comparando as médias de oócitos recuperados e de oócitos viáveis assim como as taxas de aproveitamento de oócitos, de clivagem e de blastocisto. Os dados foram fornecidos pela empresa *In Vitro* Rio, localizada na cidade de Barra do Piraí, Rio de Janeiro, Brasil. Foram realizadas 1000 sessões de aspiração folicular (OPU) em doadoras de oócitos das raças Holandesa (*Bos taurus taurus*, n=500) e Gir (*Bos taurus indicus*, n=500). Os embriões foram produzidos com o uso de sêmen de touro das raças Holandesa e Gir sexados para obtenção de fêmeas. Os dados foram analisados pelos testes 't' de "Student" não pareado (médias de oócitos recuperados e de viáveis) e qui-quadrado (taxas de aproveitamento de oócitos, de clivagem e de blastocisto) com nível de significância de 5%. As médias e os desvios padrão de oócitos recuperados e de viáveis para as raças Holandesas e Gir foram, respectivamente, $15,14 \pm 13,08$; $8,74 \pm 7,67$ e $15,57 \pm 11,9$; $9,12 \pm 7,97$, ($p > 0,05$). As taxas de aproveitamento de oócitos foram de 57,73% e 5,57% para as raças Holandesa e Gir, respectivamente, ($p > 0,05$). Foi observado que a raça da doadora e a do touro influenciou as taxas de clivagem, sendo que os resultados para as combinações (raça da doadora de oócito x raça touro) Holandesa x Holandesa (G1), Holandesa x Gir (G2), Gir x Holandesa (G3) e Gir x Gir (G4) foram 65,79 e 60,36% (G1 e G2) e 59,67 e 56,54% (G3 e G4), respectivamente. Em todos os parâmetros analisados o valor de "p" foi menor que 0,05, exceto entre G2 e G3 ($p > 0,05$). Também foi observada diferença entre as raças quando comparadas as taxas de blastocisto, sendo que as taxas foram de 28,18% e 33,34% para G1 e G2 e 26,82% e 31,09% para G3 e G4, respectivamente, sendo $p > 0,05$ entre os grupos G1 e G3 e entre G2 e G4, e $p < 0,05$ entre os demais grupos. Portanto, conclui-se que as etapas da PIV foram influenciadas pela raça da doadora e a do touro.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*, Oócitos, Genótipo.

ABSTRACT

ABSTRACT

SILVA, Ana Paula Toledo Barbosa. **Effect of donor and bull breed (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) on *in vitro* production of bovine embryos** 2012. 33p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Among the various factors that influence the efficiency of embryos *in vitro* production (IVP), the oocyte quality, the laboratorial conditions, the semen and the oocyte donor breed are the most important. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of donor oocytes breed and the bull breed (Holstein and Gir) on IVP bovine embryos comparing the recovered and viable oocytes averages as well as the recovery, cleavage and blastocyst rates. Data were provided by the company *In Vitro* Rio, located in Barra do Pirai – Rio de Janeiro, Brazil. A thousand of ovum pick up (OPU) sessions were performed in Holstein (*Bos taurus taurus*, n = 500) and Gir (*Bos taurus indicus*, n = 500) oocyte donors. The embryos were produced with Holstein and Gir sexed semen for female. Data were analyzed by nonpaired Student's 't' test (recovered and viable oocytes averages) and chi-square test (recovery, cleavage and blastocyst rates) with 5% of significance level. The averages and standard deviation of recovered and viable oocytes for Holstein and Gir breeds were, respectively, 15.14 ± 13.08 ; 8.74 ± 7.67 and 15.57 ± 11.9 ; 9.12 ± 7.97 with no statistical difference for recovered oocytes ($p > 0.05$). The oocytes recovery rate was 57.73% and 58.57% ($p < 0.05$) for Holstein and Gir breeds. It was observed that the oocyte donor and bull breed influenced the cleavage rates, and the results for the combinations (oocyte donor breed x bull breed) Holstein x Holstein (G1), Holstein x Gir (G2), Gir x Holstein (G3) and Gir x Gir (G4) were 65.79 e 60.36% (G1 and G2) and 59.67 and 56.54% (G3 and G4), respectively. For all analyzed parameters, the value of "p" was lower than 0.05, except between G2 and G3 ($p > 0.05$). It was also observed differences between breeds when compared the blastocyst rates, where the rates were 28.18 and 33.34% for G1 and G2 and 26.82 and 31.09% for G3 and G4, respectively, with $p > 0,05$ between G1 and G3 groups, and between G2 and G4 groups, and $p < 0,05$ between the other groups. Thus, we can conclude that each step of IVP technique was influenced by oocyte donor and bull breed.

Keywords: *In vitro* fertilization, Oocytes, Genotype.

LISTA DE ABREVIACES E SBOLOS

PBS - "Phosphate Buffered Saline"
BRL - "Buffalo Rat Liver Cells"
CL - Corpo Lúteo
CCO - Complexo *Cumulus* Oócito
CO₂ - Dióxido de Carbono
CR-1, CR-2 - Charles Rosenkrans
E2 - Estradiol
CEOB - Células Epiteliais do Oviduto Bovino
DMSO - Dimetilsulfóxido
eCG -.Gonadotrofina Corinica Equina
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA - Inseminao Artificial
IATF - Inseminao Artificial em Tempo Fixo
IETS - Sociedade Internacional de Transferencia de Embrião
KSOM - Meio Simples de Potássio Otimizado
LH - Hormônio Luteinizante
MIV -.Maturao *in vitro*
MOET - "Multiple Ovulation and Embryo Transfer"
mRNA - cido Ribonucleico Mensageiro
OPU - "Ovum Pick Up"
P4 - Progesterona
PGF2 α - Prostaglandina F2 α
PIV - Produo *in vitro* de Embriões
SOF – Fuido de Oviduto Sinttico
TCM 199 - "Tissue Culture Medium"
TE - Transferência de Embriões
VERO – Células Epiteliais de Rim de Macaco

ÍNDICE DE QUADROS, TABELAS E HISTOGRAMAS

Quadro 1.	Principais hormônios envolvidos no ciclo estral de fêmeas bovinas....	3
Quadro 2.	Delineamento experimental.....	27
Tabela 1.	Dados de diferentes autores sobre a avaliação de dinâmica folicular em animais zebuínos e taurinos.....	8
Tabela 2.	Média de oócitos recuperados, oócitos viáveis e oócitos maturados de acordo com o genótipo da doadora.....	29
Tabela 3.	Taxa de clivagem e de blastocisto <i>versus</i> touro de acordo com o genótipo da doadora.....	32
Histograma 1.	Número de oócitos recuperados em doadoras das raças Holandesa e Gir.....	28
Histograma 2.	Número de oócitos viáveis em doadoras das raças Holandesa e Gir....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Ciclo Estral Bovino	2
2.2 Dinâmica Folicular	2
2.3 Fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i>	4
2.4 Produção <i>In Vitro</i> de Embriões Bovinos	6
2.4.1 Etapas da Produção <i>In Vitro</i> de Embriões	6
2.5 Utilização de sêmen sexado na PIV	11
2.6 Panorama da Produção <i>In Vitro</i> de Embriões	14
2.7 Influência da Raça na Produção <i>In Vitro</i> de Embriões.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Período e Local de Obtenção dos Dados	16
3.2 Animais.....	16
3.3 Aspiração Folicular, Manipulação e Classificação dos CCOs	16
3.4 Produção <i>in Vitro</i> de Embriões, Delineamento Experimental e Análise Estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira tem se mostrado sofisticada, com avanços tecnológicos nas áreas de reprodução e utilização de biotécnicas, como a inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE), a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a clonagem.

O Brasil exporta carne bovina para mais de 100 países, consolidando sua posição como o maior exportador mundial de carne, além do aumento na produção de leite de 5,5%, que somou quase 28 bilhões de litros em 2008 (IBGE, 2009). Esse resultado coloca o Brasil como o quarto maior produtor mundial, atrás somente de Índia, China e Rússia. Com isso, modernos centros de coleta e difusão de material genético, dentre os quais sêmen e embriões, vêm crescendo e ganhando a confiança do produtor.

A produção de embriões *in vitro* é uma técnica que vem se estabelecendo em todo o mundo, principalmente no Brasil. Há um aumento no número de laboratórios que oferecem essa biotécnica, passando a se tornar cada vez mais acessível aos criadores de bovinos. O avanço das técnicas de PIV viabiliza a utilização de animais bastante jovens diminuindo o intervalo de gerações, permitindo selecionar matrizes potenciais, produzindo novilhas de reposição apenas de animais geneticamente superiores e assim acelerando o melhoramento genético. Ainda, o uso de sêmen sexado permite aumentar o impacto na eficiência reprodutiva e produzir um número desejado de macho e fêmea de acordo com o interesse do produtor.

A PIV é uma técnica na qual, em sua primeira etapa, são coletados oócitos *in vivo* de uma fêmea doadora. Para tanto, utiliza-se um aparelho de ultrassom e uma bomba de vácuo acoplada a um sistema de aspiração folicular. Esta técnica de obtenção de oócitos de animais vivos é denominada “Ovum Pick Up” (OPU). Os oócitos são aspirados, procurados, avaliados e selecionados para as etapas seguintes que são conduzidas em laboratório: maturação *in vitro* (MIV), fertilização dos oócitos *in vitro* (FIV) e cultivo dos embriões (CIV) que, após um período de sete a nove dias, são transferidos para receptoras com ciclo estral sincronizado.

Existem particularidades reprodutivas entre animais pertencentes aos grupos *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* que devem ser levadas em consideração ao empregar as biotécnicas reprodutivas (BARUSELLI *et al.*, 2007) dentre as quais destacam-se: a duração do estro, o número de folículos recrutados e o tamanho do folículo ovulatório.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar os índices de eficiência da PIV em suas diferentes etapas (Maturação, Fertilização e Cultivo) utilizando doadoras de oócitos e touros das raças Holandês e Gir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral Bovino

Após a puberdade, dá-se início à vida sexual, caracterizada por alterações periódicas, principalmente no perfil hormonal, que envolvem diversos órgãos. Nas fêmeas bovinas, estas alterações ocorrem de forma cíclica (ciclo estral), variando em intervalos médios de 20 dias para novilhas e 22 dias para vacas (SIROIS e FORTUNE, 1988). Classicamente, o ciclo estral bovino é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro tem duração de três dias, o estro de 12 a 18 horas, o metaestro de dois a três dias e o diestro, ou fase luteínica, de aproximadamente 14 dias (GONÇALVES *et al.*, 2002).

O ciclo estral é controlado pela integração coordenada entre o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido no hipotálamo; o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), produzidos na hipófise; estrógeno (E2), progesterona (P4); inibina, produzidos no ovário, e prostaglandina F2 α (PGF2 α) produzida pelo útero (Quadro 1) (GONZÁLEZ, 2002).

Quadro 1. Principais hormônios envolvidos no ciclo estral de fêmeas bovinas.

HORMÔNIO	FUNÇÃO	
GnRH	Hipotálamo	Promove a liberação do FSH e LH
FSH	Hipófise anterior	Estimula o desenvolvimento folicular e a secreção de estradiol
LH	Hipófise anterior	Estimula a ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo
Estradiol	Folículo (ovário)	Estimula a manifestação do cio e a liberação de LH
Progesterona	Corpo lúteo (ovário)	Manutenção da gestação
Inibina	Folículo (ovário)	Diminuição dos níveis de FSH

Fonte: Hafez e Hafez, 2004.

Segundo Mies Filho (1987), o impacto do FSH sobre o ovário promove o desenvolvimento de folículos maduros os quais produzem E2. Este estrógeno, ao atingir certo nível na circulação sanguínea, inibe a secreção do FSH hipofisário, ao mesmo tempo em que estimula a secreção do LH, o qual determinará o rompimento do folículo maduro (ovulação) e promoverá, como consequência, a formação do corpo lúteo, cuja secreção de progesterona vai inibir a ação do LH hipofisário (“Feedback” negativo). Estabelece-se uma diminuição dos hormônios hipofisários, acarretando a degeneração do folículo dominante e uma nova onda se inicia, onde FSH recomeça o ciclo.

2.2 Dinâmica Folicular

Nos ovários de uma fêmea pré-púbere, podem ser encontradas as seguintes estruturas foliculares: folículos primordiais (oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa achatadas); folículo primário (as células da granulosa passam da forma achatada para a forma cubóide); folículo secundário (aumento no número de células da granulosa); folículo terciário ou folículo antral (surgimento de uma cavidade repleta de líquido chamado antro) e folículo de Graaf ou folículo pré-ovulatório (HAFEZ e HAFEZ, 2004). O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo *cumulus-*

oócito (CCO). O conjunto de células próximas à zona pelúcida, em íntimo contato com o oócito por junções intercomunicantes, é denominado *corona radiata*.

Com o advento da ultrassonografia, pesquisadores comprovaram a teoria de que o crescimento dos folículos se dava em forma de ondas, e verificaram a ocorrência de duas a quatro ondas de crescimento folicular em cada ciclo estral bovino (GINTHER et al., 1989a).

O padrão cíclico de crescimento de certo número de folículos antrais é denominado de onda folicular (FERREIRA, 2010). A onda folicular compreende o crescimento de um grupo de pequenos folículos antrais (4-5 mm de diâmetro), seguida da seleção de um folículo dominante e da regressão dos folículos subordinados (BARUSELLI, 1997). Os folículos dominantes que crescem e atingem seu diâmetro máximo no meio do ciclo estral, sob altos níveis de progesterona, não ovulam e iniciam um processo de regressão, permitindo o início de uma nova onda de crescimento folicular (MAPLETOFT et al., 1994). O folículo dominante que se desenvolve durante a última onda de crescimento folicular de cada ciclo estral é o folículo ovulatório, e essa onda culmina com a ovulação (LUCY et al., 1992).

Cada onda possui uma duração de sete a dez dias, passando por diferentes estádios de desenvolvimento, que são recrutamento ou emergência, seleção ou divergência, dominância, atresia ou ovulação (GONÇALVES, 2008b). As gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH, atuam na manifestação, manutenção e suspensão destes eventos (AERTS e BOLS, 2010).

A emergência ou recrutamento de uma onda é caracterizada por um crescimento em média de 20 pequenos folículos antrais que são estimulados pelo FSH e destes folículos, apenas um continua seu desenvolvimento, enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (atresia), estabelecendo-se então o fenômeno da divergência folicular (BARUSELLI et al., 2007). A divergência folicular é o início da maior diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos de cada onda folicular (GINTHER et al., 1996). Após o recrutamento e seleção, um folículo se destaca e continua seu crescimento, tornando-se o folículo dominante, enquanto os outros folículos iniciam o processo de atresia e são denominados folículos subordinados (FERREIRA, 2010).

O folículo dominante rapidamente se desenvolve no inibidor primário da secreção de FSH através da secreção de estradiol e inibina, mas ele é capaz de continuar seu crescimento, mesmo em níveis basais de FSH. As baixas concentrações de FSH têm a vantagem de impedir a emergência de um novo grupo de folículos (AERTS e BOLS, 2010). De acordo com Ginther et al. (2001), no início da divergência folicular ocorrem alterações no desenvolvimento do maior folículo, que o tornam responsivo a baixas concentrações de FSH, as quais são inadequadas ao desenvolvimento dos outros folículos.

Após a divergência, e na presença de altos níveis de progesterona, que promove a redução da frequência na pulsatilidade de LH, o folículo dominante torna-se anovulatório (GINTHER et al., 1989c), o folículo dominante só se tornará ovulatório se os níveis de progesterona (P4), estiverem baixos, pois a progesterona bloqueia a liberação de LH e a ovulação, a diminuição nos níveis plasmáticos de progesterona permite o aumento dos níveis de estrógeno e consequentemente de LH, levando à ovulação do folículo dominante (BARUSELLI et al., 2007). Após a ovulação, as células que permanecem no folículo rompido proliferam e forma o corpo lúteo, cuja função domina o ciclo do dia 4 ao dia 15, sendo que por volta do dia 15 ou dia 16 ocorre a luteólise pela ação da PGF2 α uterina, e o estabelecimento de um novo estro (BALL e PETERS, 2006).

2.3 Fisiologia Reprodutiva de Fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (BARUSSELLI et al. 2007). Raças *Bos taurus indicus* são consideradas diferentes de *Bos taurus taurus* em relação ao número de ondas de crescimento folicular, número de folículos recrutados por onda, taxa de crescimento folicular e diâmetro máximo do folículo dominante. Portanto, os dados relatados para raças taurinas não devem ser extrapolados para as raças zebuínas (VIANA et al., 2010).

Uma particularidade observada entre zebuínos e taurinos diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Estudos realizados em animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989a). Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000).

De acordo com Carvalho et al. (2007), fêmeas *Bos taurus indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus taurus* ($33,4 \pm 3,2$ versus $25,4 \pm 2,5$). Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de transferência de embriões e de OPU-PIV, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas (BARUSSELLI et al. 2007). Bó et al. 2003 sugerem que o maior número de folículos presentes nos ovários de *Bos taurus indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH. *Bos taurus indicus* tendem a ter mais ondas foliculares e uma população maior de folículos pequenos (<5 mm) em comparação com raças *Bos taurus taurus* (FIGUEREDO et al., 1997).

Estudos em bovinos demonstraram que o diâmetro máximo dos folículos durante o ciclo estral varia conforme a raça e a espécie (BARUSELLI, 1997). Trabalhos demonstraram diâmetros de folículos ovarianos inferiores para *Bos taurus indicus* (RHODES et al., 1995) quando comparados aos de *Bos taurus taurus* (GINTHER et al., 1989a). Em *Bos taurus taurus* com duas ondas de crescimento folicular são descritos diâmetros de 17,1 mm e 16,5 mm para a primeira e segunda onda, respectivamente (BARUSELLI et al., 2007). Já em *Bos taurus indicus* os diâmetros relatados foram de 11,3 mm e 12,1 mm, respectivamente, para fêmeas da raça Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997); e 9,5 mm e 10,5 mm para fêmeas da raça Gir (GAMBINI et al., 1998). Para animais com três ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos foram de 16,0, 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus taurus* (GINTHER et al., 1989b) e de 10,4, 9,4 e 11,6 mm para *Bos taurus indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997). Mello (2011) ao avaliar a dinâmica folicular de fêmeas zebuínas da raça Sindi, obteve valores de 10,4 mm e 0,90 mm/dia para o diâmetro máximo e taxa de crescimento do folículo dominante, respectivamente, indicando diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.

A área do corpo lúteo também é menor nas fêmeas zebuínas (BARUSELLI et al., 2007). Raças zebuínas têm corpo lúteo menor que raças taurinas, variando de 17 a 21 mm de diâmetro (FIGUEREDO et al., 1997), ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 e 30 mm (GINTHER et al., 1989b). Da mesma forma, a concentração de progesterona produzida pelo CL também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (BARUSELLI et al., 2007). Segundo Randel (1976) fêmeas zebuínas apresentam menor concentração de progesterona por grama de tecido luteínico do que fêmeas taurinas.

Fêmeas *Bos taurus indicus* geralmente apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas) do que raças taurinas (SARTORELLI et al., 2005), o que dificulta sua detecção (BÓ et al., 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresenta diferenças entre estas duas raças (BARUSELLI et al., 2007).

Os resultados apresentados na literatura são indicativos de que a divergência folicular em *Bos taurus indicus* ocorre com diâmetros inferiores aos reportados para *Bos taurus taurus* (BARUSELLI et al., 2007). Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), a divergência folicular tem início por volta do dia 2,8 após a emergência, quando o folículo dominante atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2 mm (GINTHER et al., 1996). Em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), descreve-se um período de 2,5 a 2,7 dias após a ovulação (CASTILHO et al., 2006), com o folículo dominante com 6,2 mm de diâmetro, e o folículo subordinado com 5,9 mm (GIMENES et al., 2005). Mello (2011) obteve valores para a emergência da onda, e para o intervalo entre a emergência da onda e a ovulação, de 4,5 e 5,8 dias, respectivamente. A Tabela 1 apresenta mais alguns dados sobre a avaliação da dinâmica folicular em animais zebuínos e taurinos. Esses dados são indicativos de que é necessário conhecer as características do desenvolvimento folicular para implantar eficientes programas de manejo reprodutivo, levando em consideração as diferenças entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*.

Tabela 1 - Dados sobre a avaliação de dinâmica folicular em animais zebuínos e taurinos.

Categoria e raça da fêmea	Referências	Ondas (%)			Duração do ciclo estral (dias)	Tamanho do folículo pré-ovulatório (mm)
		2	3	4		
Novilhas Holandesas	GINTHER <i>et al.</i> (1989b)	83,3	16,7	0,0	2 ondas: 20,4	2 ondas: 16,5
					3 ondas: 22,8	3 ondas: 13,9
Novilhas Holandesas	SARTORI <i>et al.</i> (2004)	55,6	33,3	11,1	22,0	15,0
Vacas Holandesas lactantes de alta produção	SARTORI <i>et al.</i> (2004)	78,6	14,3	7,1	22,9	17,2
Vacas Holandesas em lactação	TAYLOR & RAJA MAHEDRAN (1991)	81,3	18,7	0,0	2 ondas: 20,8	>10
					3 ondas: 29,7	
Novilhas mestiças Holandesas Zebu	BORGES <i>et al.</i> (2001)	33,3	58,3	2,8	2 ondas: 19,5	2 ondas: 13,3
					3 ondas: 22,0	3 ondas: 11,8
Vacas Gir	VIANA <i>et al.</i> (2000)	6,67	60	26,67		9 a 13
Vacas Gir	VIANA <i>et al.</i> (1999)		60	26,67	3 ondas: 21,11	
					4 ondas: 22,25	
Vacas e novilhas Nelore	FIGUEIREDO <i>et al.</i> (1997)				2 ondas: 20,65	2 ondas: 12,05
					3 ondas: 22,00	3 ondas: 11,61

Fonte: Martins, (2005)

2.4 Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma técnica que vem sendo largamente utilizada para estudos da fisiologia da maturação e fecundação dos oócitos, capacitação espermática, cultivo de embriões, clonagem, transferência de genes, microinjeção, sexagem, congelação/descongelação de oócitos e embriões (COELHO et al., 1998). Sua aplicação em escala comercial se tornou viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008a). Os procedimentos de PIV também são aplicados em todo o mundo com objetivos diferentes para uma variedade de espécies animais de produção, de companhia, exóticos, selvagens e de espécies de animais ameaçadas de extinção (DEL CAMPO et al., 1995; BAINBRIDG et al., 1999).

O principal objetivo da PIV comercial consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis e também aquelas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como em vacas doadoras que apresentam infertilidade provocada por tratamentos com gonadotrofinas. Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto (2 a 3 semanas) podem ser usadas como doadoras na PIV (BUENO e BELTRAN, 2008).

A PIV permite também o aproveitamento de vacas de alto valor genético mas inférteis (obstrução ou aderências nos diversos segmentos da tuba uterina, doenças endometriais, cérvix tortuosa ou fibrótica etc.), além de ser base para utilização de outras biotécnicas como a produção de animais clonados e transgênicos (BRACKETT e ZUELKE, 1993).

Com o emprego da TE podem ser obtidos de 8-12 crias/vaca/ano e com PIV mais de 30 crias/vaca/ano (FERREIRA, 2010). Segundo Bousquet et al. (1999), outra grande vantagem desta técnica é que não há necessidade de superestimular as fêmeas, reduzindo os riscos de problemas reprodutivos decorrentes da administração hormonal. Além disso, a fertilização *in vitro* de oócitos recuperados permite a utilização de touros diferentes para doadoras individuais (SANTL et al., 1998). Contudo, ainda são necessárias melhorias substanciais para aumento da eficiência e redução de custos, principalmente o aperfeiçoamento da técnica de criopreservação conforme destacou Ferreira (2010).

2.4.1 Etapas da Produção *In Vitro* de Embriões

Atualmente a produção *in vitro* de embriões compreende as seguintes etapas: colheita de oócitos; a maturação oocitária *in vitro* (MIV), a fecundação dos oócitos *in vitro* (FIV), o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados (VARAGO et al., 2008).

2.4.1.1 Colheita de oócitos por aspiração folicular

Desde a década de 80, a aspiração folicular (OPU) seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV) tornou-se uma técnica conhecida e estabelecida para produção comercial de embriões (MERTON, 2009). Antes do procedimento da OPU, os animais são contidos em troncos de contenção e as fezes removidas do reto e a área perineal limpa com água e sabão. Cada doadora recebe anestesia epidural, usando de 5,0 a 7,0 ml de lidocaina a 2 %, para diminuir o peristaltismo e o desconforto (PONTES et al.; 2009). Nesta técnica utiliza-se um aparelho de ultrassonografia equipado com transdutor setorial intravaginal de 5 ou 7,5 MHz e um dispositivo guia para punção folicular. Folículos com diâmetro superior a 3

mm são identificados, mensurados e puncionados utilizando-se agulhas 19G e uma pressão de vácuo de 80mmHg, correspondendo a um fluxo de 14ml de água/min.. O líquido folicular é inicialmente recuperado em tubos cônicos plásticos de 50 ml, contendo DPBS ou PBS acrescido de 1 % de soro fetal bovino (SFB) e 100 UI/ml de heparina sódica, sendo posteriormente os oócitos separados em um filtro de coleta de embriões com malha de 80 µm (Millipore). Os complexos *cumulus*-oócito recuperados são transferidos para placas de cultivo contendo PBS acrescido de 10 % de SFB a 37 °C e avaliados, em um microscópio estereoscópio com aumento final de 50 vezes (RAMOS et al.; 2006).

Ao longo dos anos, a técnica tem se mostrado segura, viabilizando a recuperação, maturação e fecundação de oócitos imaturos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal (PIETERSE et al., 1991; BOLS et al., 1995, BOLS et al., 1996). A punção folicular pode ser feita em 2 sessões semanais, por alguns meses, sem prejudicar o futuro desempenho reprodutivo da doadora (GONÇALVES et al., 2002). Os oócitos utilizados na PIV são em geral aspirados do interior de folículos com diâmetro entre 2,0 e 8,0 mm, antes da divergência folicular. Oócitos presentes em folículos menores que 2,0 mm de diâmetro geralmente não são competentes para reiniciar a meiose, ao passo que uma elevada porcentagem de folículos maiores que 8 mm já está em processo de atresia ou apresenta oócitos em processo de maturação, ressaltando-se que em ambos os casos, a viabilidade dos oócitos está comprometida (GONÇALVES et al., 2008b).

No entanto, quando realizamos o procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassom em programa comercial de produção de embriões, é comum todos os folículos serem puncionados com o intuito de maximizar o rendimento de oócitos obtidos.

2.4.1.2 Qualidade de oócitos

A relação entre o diâmetro folicular e a qualidade do oócito, parece ter grande importância na seleção dos folículos que serão aspirados (BOLS et al.,1995). O sucesso e a eficiência do programa da PIV dependem da quantidade e da qualidade dos CCOs recuperados. A qualidade do oócito descrita como a capacidade de desenvolvimento ou a competência deste gameta para se transformar em um embrião após a fertilização pode ser expressa tanto morfolologicamente quanto intrinsecamente (MERTON et al., 2009). A eficiência da produção de embriões como parâmetros para qualidade do oócito é determinada principalmente durante a fase de coleta e de maturação, enquanto a qualidade dos embriões é determinada durante a fase de cultivo *in vitro* (MERTON et al., 2003 e LONERGAN et al., 2006).

Imediatamente após a recuperação dos complexos *cumulus*-oócitos é realizada a classificação dos mesmos de acordo com as características das células do *cumulus* e do ooplasma: Grau I –*cumulus*-oócito compacto, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; Grau II –*cumulus*-oócito compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura; Grau III –*cumulus*-oócito presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; Grau IV – Degenerado, vacuolizado ou fragmentado; Desnudos – totalmente descobertos pelas células do *cumulus*-oócito ou parte coberto por elas; atrésico –*cumulus*-oócito escuro ou presença de sinais de degeneração citoplasmática (GONÇALVES, 2002).

As características do folículo tem uma significativa influência sobre o potencial de desenvolvimento do oócito uma vez que, após aspirado do folículo, seu potencial de desenvolvimento é limitado. Embora a adição de uma variedade de gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento possam aumentar o desenvolvimento embrionário, estes aumentos tendem a ser modestos e raramente alcançam os índices obtidos com oócitos maturados *in vivo* (RIZOS et al., 2002). A condição fisiológica da doadora, considerando-se idade, peso, raça, nutrição e a própria variação individual, interfere na qualidade dos oócitos. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são frequentes (SENEDA e BLASCHI, 2004). Katska e Smorag (1984) notaram uma redução na produção de gametas de animais mais velhos, embora não tivessem encontrado diferença na qualidade dos oócitos entre animais jovens (a partir dos 18 meses) e senis (até 17 anos).

Quanto ao peso, animais com baixo escore de condição corporal são doadoras de oócitos de menor capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LOPEZ RUIZ et al., 1996) e animais submetidos ao estresse também são doadoras de oócitos com menor competência (SENEDA et al., 2000).

Merton *et al.* (2009) investigaram os fatores genéticos que influenciam o resultado de OPU-PIV e relataram uma menor variabilidade dos resultados na OPU-PIV em novilhas de irmãos completos do que entre os animais não relacionados geneticamente. Ainda neste estudo, Merton *et al.* (2009) demonstraram que as correlações genéticas foram de acordo com as fenotípicas, confirmando a sugestão de que o CCO de qualidade é independente do número total de CCOs coletados através de OPU. Esta é uma descoberta importante, pois a qualidade do CCO irá resultar em uma maior proporção de embriões produzidos. Fêmeas introduzidas em um programa de PIV devem estar isentas de enfermidades reprodutivas e infecciosas, devendo ser realizada avaliação através de exames laboratoriais comprobatórios de sanidade (NANZE, 2010). Os agentes que mais prejuízos trazem à pecuária nacional em termos de abortamento e infertilidade são os causadores da brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa, diarreia bovina a vírus (BVD), campilobacteriose, tricomonose, neosporose e hemofilose. O mais novo patógeno da lista é a bactéria *Escherichia coli*, presente normalmente na microbiota animal e que provoca gastroenterites, podendo gerar alterações nos oócitos que levem à sua morte ou inviabilidade (PITOMBO, 2011).

Fatores ambientais podem influenciar o desempenho reprodutivo de animais de produção no decorrer do ano (ALMEIDA et al., 2010). Tem sido demonstrado que a exposição de doadoras ao stress calórico tem uma perda na função reprodutiva maior em raças taurinas do que em raças zebuínas (ROCHA et al. 1998). Takuma et al. (2010) ao estudarem o efeito da qualidade e quantidade de oócitos recuperados no verão e no inverno com doadoras da raça Japanese Black, verificaram que a qualidade dos oócitos não foi afetada, porém animais submetidos a aspiração no verão, obtiveram decréscimo no número de oócitos recuperados em relação a aspirações realizadas no inverno. Porém, estudos recentes realizados com animais da raça Brahman, objetivando avaliar os meses de melhor eficiência reprodutiva para se estabelecer estratégias de manejo visando melhores índices na PIV, não mostraram diferenças significativas entre as estações do ano, recomendando esses procedimentos em qualquer período (LUCIA E MARTINEZ, 2010 e ALMEIDA et al., 2010).

Atualmente, a aspiração folicular tem sido realizada em momentos aleatórios do ciclo estral. Os resultados de campo têm mostrado que a qualidade dos oócitos não se altera em função da fase do ciclo estral. No entanto, o número de folículos disponíveis para a aspiração apresenta considerável variação, sendo o início de onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência de captação dos oócitos (SENEDA et al., 2005).

2.4.1.3 Maturação *in vitro*

A maturação meiótica do oócito *in vivo* ocorre próxima à ovulação, quando o folículo atinge seu diâmetro máximo, mas *in vitro* a maturação meiótica inicia-se imediatamente após a remoção do oócito do interior do folículo (GONÇALVES et al., 2008a). A maturação dos oócitos é um longo processo durante o qual os oócitos adquirem a capacidade intrínseca de progresso através de eventos subsequentes de desenvolvimento. Tais eventos são denominados de maturação nuclear e citoplasmática sendo complexos e distintos (FERREIRA et al., 2009). A maturação nuclear oocitária bovina refere-se à segregação cromossômica (FERREIRA et al., 2008). Em oócitos mamíferos, a meiose inicia-se durante a vida fetal e posteriormente é parada na fase de diplóteno da primeira divisão meiótica (prófase I) sendo o oócito, nesta fase, denominado oócito em Vesícula Germinativa (VG), permanecendo assim até próximo à ovulação. A conclusão da primeira divisão meiótica é desencadeada pelo aumento hormonal de LH pré-ovulatório, a meiose avança para o estágio de metáfase II, onde é novamente parada até a fecundação. No entanto, quando os oócitos mamíferos são retirados dos folículos e cultivados, eles espontaneamente retomam apenas a maturação meiótica (nuclear) sem estimulação hormonal. (GOESEELS, 2006). Os eventos que ocorrem durante a maturação de oócitos dependem não só da dinâmica correta de separação de cromossomos durante a maturação nuclear, mas também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do armazenamento de mRNA, proteínas e fatores de transcrição necessários para que esse processo ocorra (FERREIRA et al., 2009).

A maturação citoplasmática pode ser descrita como as alterações estruturais e biológicas que permitem que o oócito seja fecundado e se desenvolva como embrião. Esta maturação envolve a redistribuição de organelas citoplasmáticas, como os grânulos corticais (GC), as mitocôndrias, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (AVELINO, 2004; DULCIBELLA et al., 1990 *apud* APPARÍCIO et al., 2011). As transcrições e as proteínas armazenadas no citoplasma do oócito são de fundamental importância para o processo de maturação e para assegurar o desenvolvimento dos embriões até ao estágio de oito células (em bovinos), fase em que o genoma embrionário é ativado e a síntese de novas proteínas torna-se necessária (FERREIRA et al., 2009).

O TCM 199 (“Tissue Culture Medium 199”) é o meio mais difundido entre os laboratórios de PIV. Seus principais suplementos são o soro fetal bovino, FSH, LH, piruvato, penicilina e estreptomicina. A maturação *in vitro* varia de 18 a 24 horas em 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2008b). As condições ideais para MIV devem ser determinadas para melhorar o desenvolvimento dos oócitos. A maturação de oócitos *in vitro* varia entre os laboratórios, ocorrendo entre 16 e 28 horas, em média é utilizado 24 horas. Embora não haja tempo de maturação ideal, não se pode excluir que a produção de embriões será afetada por um tempo maior que 24 horas, o que provavelmente é causado pelo envelhecimento do oócito (MERTON et al., 2003).

2.4.1.4 Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os oócitos são fertilizados *in vitro* com sêmen fresco ou descongelado. Em função da praticidade e da higiene, na maioria das vezes utiliza-se sêmen congelado. Neste caso, os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, do crioprotetor, do diluidor e das células mortas. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de Percoll e a técnica do “Swim-up” (GONÇALVES et al., 2008b). O Percoll é preparado em diferentes concentrações para formar o gradiente necessário de separação espermática (geralmente 45 e

90 %) diluído ao meio SP-TALP (MACHADO et al., 2009). O gradiente de Percoll é uma das técnicas mais difundidas na PIV de diversas espécies, sendo um meio comercial preparado em diferentes densidades e que seleciona os espermatozoides através da centrifugação (MACHADO et al., 2009).

O “swim up” é um procedimento que utiliza a capacidade dos espermatozoides migrarem em direção ascendente, proporcionando alta motilidade, onde os espermatozoides vivos são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores pela motilidade ascendente. Porém, produz apenas 10 a 20% do total inicial da população de espermatozoides bovinos (PARRISH et al., 1995). Schweitzer (1996) demonstrou que o gradiente de Percoll é superior ao “swim up” aumentando a motilidade e a recuperação de espermatozoides com boa habilidade de fecundar e longa sobrevivência. Embora o “swim up” tenha como vantagens ser de fácil execução, baixo custo, recuperar amostras límpidas e com espermatozoides com alta motilidade, tem como principal desvantagem apresentar baixa taxa de recuperação e, por essa razão, só pode ser usado para amostras com alta concentração de células (PARRISH et al., 1995). Da mesma maneira, observou-se que o Percoll facilita a capacitação dos espermatozoides, requerendo menores concentrações de heparina (SCHWEITZER, 1996).

In vivo, os espermatozoides percorrem um longo trajeto para chegar ao infundíbulo e fecundar o oócito. Durante esse percurso, glicosaminoglicanas presentes no trato genital feminino induzem sua capacitação. Para fertilização *in vitro*, a capacitação espermática é, geralmente, promovida por agentes capacitantes como a heparina e os ionóforos de cálcio. (GONÇALVES et al., 2008b). Em relação às raças, Varago et al. (2008) observaram a necessidade de concentrações maior de heparina bem como maior concentração espermática para FIV em zebuínos quando comparada aos taurinos.

De acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios, o tempo de co-incubação dos oócitos com os espermatozoides pode variar de seis a vinte a quatro horas (GARCIA et al., 2005), a uma temperatura de 39 °C, em uma atmosfera de 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada. Os espermatozoides são adicionados às gotas de fecundação contendo os oócitos em uma concentração final que pode variar 1 x 10⁶ a 2 x 10⁶ espermatozoides por mililitro (GONÇALVES et al., 2008a e MEHMOOD et al., 2009). Para cada reprodutor utilizado no sistema PIV, alguns ensaios devem ser previamente desenvolvidos para ajustar a concentração espermática e a dosagem de heparina com a finalidade de maximizar ambos, capacidade fecundante e competência de desenvolvimento embrionário (COELHO et al., 1998). Além disso, é necessário ajustar a concentração espermática ao período de incubação de maneira que não prejudique o desenvolvimento do oócito e evite fecundações anormais (RAMOS et al., 2000).

2.4.1.5 Cultivo *in vitro*

Existem diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e alguns são claramente melhores do que outros (FARIN et al., 2006). Os sistemas de cultivo podem ser divididos basicamente em dois grupos: a) Co-cultivo no qual células somáticas são incluídas ao meio, sendo comumente suplementado com soro fetal bovino; b) Meios quimicamente definidos que são aqueles que não são acrescidos de células somáticas (THOMPSON, 1996). Os dois meios mais comumente utilizados para o co-cultivo *in vitro* de embriões bovinos são o TCM 199 e o Menezo B2. Eles são descritos como meios complexos porque os componentes múltiplos que estão incluídos na sua formulação incluem vitaminas, aminoácidos, sais, purinas, nucleotídeos etc, que refletem as necessidades de células somáticas ao invés dos embriões (BAVISTER, 1995 *apud* THOMPSON, 1996). As células somáticas mais utilizadas em meios de co-cultivo

são as células epiteliais do oviduto bovino (CEOB), células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo obtidas de rim de macacos), células BRL (“Buffalo Rat Liver Cells”), células endometriais ou do cultivo em meio condicionado por vários tipos celulares (GONÇALVES et al., 2008b).

Sistemas de cultivo sem suporte de células somáticas são geralmente referidos como sistemas definidos ou semi-definidos, dependendo da presença de soro (ou proteínas) ou da suplementação de macromoléculas sintéticas (THOMPSON, 1997). Para desenvolver um sistema de cultura definido, há duas possíveis abordagens que têm igual mérito: a) determinar as necessidades bioquímicas do embrião ou b) analisar o ambiente que o embrião se encontra *in vivo* (THOMPSON, 1996). Atualmente, o co-cultivo dos embriões com sistemas complexos tem sido substituído por sistemas que utilizam 5 % de O₂ e meios simples como Charles Rosenkrans (CR-1, CR-2), fluido sintético de oviduto bovino (SOF) ou meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos. Esses sistemas têm inúmeras vantagens em termos de praticidade e economia, podendo ser utilizados com meios quimicamente definidos ou com soro sanguíneo (GONÇALVES et al., 2008b).

Os meios estáticos ou não sequenciais são aqueles sobre os quais não se efetuam modificações durante todo o período de cultivo. Ao contrário, os meios sequenciais são aqueles em que a composição vai sendo modificada mediante a adição de substâncias ou troca de todo o meio em função das necessidades ou para eliminar os produtos do metabolismo embrionário, que podem afetar sua viabilidade (LANE et al., 2003). Neste contexto, muitos laboratórios adotam o procedimento de substituição do meio de cultivo ou acréscimo de novo meio após 48 horas de desenvolvimento embrionário, procedimento esse também chamado de “feeding” (THOMPSON et al., 1998).

O cultivo geralmente se estende até o 7º dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação. Para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros, o cultivo *in vitro* pode se estender até o 8º ou 9º dia após a fecundação *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

2.5. Utilização de Sêmen Sexado na PIV

O emprego do sêmen sexado permitiu aumentar o impacto na eficiência reprodutiva de carne e de leite, além de produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas de acordo com o objetivo do produtor, a fim de se obter vantagens das características que são limitadas ou influenciadas pelo sexo, e com isso facilitar as práticas de manejo (RATH e JOHNSON et al., 2008). Adicionalmente, este fato permite a seleção de fêmeas potencialmente superiores, produzindo novilhas de repasse especificamente daqueles animais (MOCÉ et al., 2006). Um ganho de 15% é esperado comparado ao sêmen convencional, além da redução dos custos com os testes de progênie, transferência de embriões e marcadores moleculares (DE VRIES et al., 2008). Além disso, os bezerros resultantes de sêmen sexado não diferem dos bezerros oriundos de sêmen convencional, incluindo o tempo de gestação, peso ao nascer, taxa de mortalidade e ganho de peso (TUBMAN et al., 2004).

A elevada proporção de machos entre os embriões mamíferos produzidos *in vitro* pode limitar a aplicação da técnica de PIV, sobretudo em rebanhos bovinos com aptidão leiteira, e o uso do sêmen sexado pode reverter essa situação (RHEINGANTZ et al., 2004). Essa inversão é benéfica quando as fêmeas possuem um maior valor de mercado do que os machos, como nas explorações econômicas leiteiras (RATH et al., 2009).

Porém, o procedimento de sexagem espermática afeta algumas características estruturais do espermatozoide bovino, mas não elimina sua capacidade de gerar embriões *in vitro*, apesar

da sua reduzida motilidade progressiva e integridade de membranas acrossomal e mitocondrial (CARVALHO et al., 2010). A produção *in vitro* empregando o sêmen sexado tem sido investigada em vários estudos, e algumas diferenças tem sido atribuídas a diversos fatores (ARRUDA et al., 2011).

Alguns estudos tem relatado baixas taxas de clivagem e de blastocisto (STINSHOFF et al., 2012), enquanto outros não tem observado diferenças no desenvolvimento de blastocistos entre o sêmen sexado e o não-sexado (LU e SEIDEL, 2004; CARVALHO et al., 2010). Essas diferenças podem ser devidas aos vários métodos de seleção dos oócitos, qualidade do sêmen sexado ou tipo de cultivo (ARRUDA et al., 2011). Contudo, diferenças individuais também foram observadas, mostrando que o sêmen de alguns touros é mais negativamente afetado do que outros touros pelo processo de sexagem espermática (BLONDIN et al., 2009).

Nos processos *in vitro*, um glicosaminoglicano, a heparina, tem sido utilizada para capacitar espermatozoides bovinos. No entanto, existem variações individuais entre touros quanto à concentração de heparina necessária para a capacitação espermática. A concentração ideal de heparina varia de 2 a 100 µg/mL de meio, dependendo do touro e do processo de separação espermática. Há evidências de que espermatozoides separados pelo gradiente de Percoll necessitam de menor concentração de heparina do que aqueles separados por “swim up”. A concentração mais eficiente, nos diferentes processos e para os diferentes touros, está em torno de 10 µg/mL de meio. Atualmente, a heparina é o glicosaminoglicano mais utilizado para capacitar espermatozoides para a fecundação *in vitro*, em virtude dos resultados satisfatórios e compatíveis com os processos *in vivo* (GONÇALVES et al., 2008).

Nesse sentido, Lu e 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 aditivo para se induzir à capacitação, indicando que as concentrações espermáticas efetivas do mesmo touro podem diferir entre o sêmen sexado e o não-sexado. Também, fatores associados com o processo de sexagem, possam talvez vir parcialmente a capacitar o espermatozoide. Essas observações também foram observadas por Palma et al. (2008), que verificaram que alguns touros produziam altas porcentagens de blastocisto com somente 2 µg/mL de heparina no cultivo, enquanto outros touros necessitavam de mais heparina (5-10 µg/mL) para produzirem altas taxas de blastocisto, indicando que um ajuste nas concentrações de heparina para cada touro poderia aumentar estas taxas em sistemas PIV. No entanto, em casos de produção *in vitro* comercial, esse procedimento nem sempre é possível, em razão do custo e da disponibilidade de doses de sêmen (GONÇALVES et al., 2008).

Lu e Seidel (2004) também demonstraram que as concentrações de heparina em sistemas PIV com o sêmen sexado podem aumentar a taxa de polispermia. Contudo, mesmo com altas concentrações de heparina (10 µg/mL), 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 em sistemas PIV (BOUSQUET et al., 1999), indicando que mais pesquisas são necessárias para se identificar as diferenças entre o sêmen de diferentes touros, e com isso se otimizar os sistemas de produção *in vitro*.

Spinaci et al. (2006) demonstraram que o sêmen sexado não necessita de outras tantas condições de capacitação em sistemas 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 o possível das ovulações. O nível de capacitação poderia ajudar os laboratórios a determinar as condições ideais em sistemas PIV, a fim de se obter altas porcentagens de blastocistos produzidos *in vitro* (BLONDIN et al., 2009).

Outras diferenças nos procedimentos em sistemas PIV, tais como menor gota de fertilização (CRAN et al., 1995) e a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL

(BARCELÓ-FIMBRES et al., 2011) foram requeridos para se obter os melhores resultados (ARRUDA et al., 2011). Neste contexto, a criopreservação de embriões também vem demonstrando um importante papel, sendo que o método da vitrificação funciona de forma bem melhor nos embriões produzidos *in vitro* de várias espécies (XU et al., 2009). No entanto, Xu et al. (2006), ao produzirem embriões *in vitro* vitrificados, não observaram diferenças na viabilidade pós-congelamento entre blastocistos produzidos com o uso do sêmen sexado e não-sexado.

Vários estudos têm demonstrado que os embriões bovinos machos produzidos *in vitro* desenvolvem-se mais rapidamente do que embriões fêmeas (PEIPPO et al., 2010). No estudo de Carvalho et al. (2010) não foram observadas diferenças na formação dos blastocistos e na velocidade de desenvolvimento destes entre embriões de machos e fêmeas derivados de sêmen sexado. Algumas variações observadas têm sido atribuídas ao efeito do touro, do protocolo PIV, ou do sistema de cultivo (PEIPPO et al., 2001). Também no estudo conduzido por Carvalho et al. (2010), independente da redução na integridade de membrana e na motilidade progressiva do sêmen sexado, não foi observado uma menor produção de embriões em sistemas PIV. Talvez uma diminuição na motilidade e na porcentagem de células com membrana acrossomal intactas causadas pelo processo de sexagem espermática não seja crítico para as condições *in vitro*, assim como são para as condições *in vivo*. Contudo, embriões derivados de sêmen sexado apresentam uma alta proporção de mitocôndrias imaturas e danos nas membranas nucleares, e uma falta no número de organelas, como mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso, quando comparados com embriões derivados de sêmen não-sexado (PALMA et al., 2008). Essa discrepância no desenvolvimento embrionário pode ser devido à fragmentação do DNA no espermatozoide de alguns touros, o que pode explicar porque alguns touros são mais adversamente afetados pelo processo de sexagem espermática do que outros touros (GOSÁLVES et al., 2011).

A fim de se explicar as baixas taxas de desenvolvimento embrionário e os danos ultraestruturais dos embriões produzidos *in vitro* com o uso do sêmen sexado observado por alguns autores, Morton et al. (2007) realizou estudos sobre a expressão gênica, e demonstraram que embriões derivados de sêmen sexado exibiram uma expressão diferencial de genes importantes no desenvolvimento celular, quando comparados com embriões derivados de sêmen não-sexado. 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 tenha sido detectadas. Do mesmo modo, Stinshoff et al. (2012) demonstraram que o processo de sexagem do sêmen usado em sistemas PIV não influencia na qualidade embrionária precoce a nível molecular. As diferenças observadas entre os embriões derivados de sêmen sexado e de sêmen não-sexado poderiam explicar a alta perda embrionária entre os 30 e 90 dias de prenhez, quando o sêmen sexado é usado para inseminar vacas e novilhas (UNDERWOOD et al., 2010).

Em sistemas PIV, a habilidade de se reverter o processo de sexagem também é possível. Este processo consiste em se descongelar doses de sêmen convencional para posterior envio destas doses ao processo de sexagem, e congelá-las novamente para um uso futuro em Inseminação Artificial (IA) ou PIV, o que permite a estas doses serem enviadas para um novo sistema PIV, distante do laboratório de sexagem, removendo o fator comum destes sistemas, que seria em manter os touros alojados para facilitar o processo de sexagem ou para a congelamento e descongelamento das amostras, podendo assim ser usadas imediatamente após o processo de sexagem (ARRUDA et al., 2011). Esta técnica poderia oferecer novas possibilidades para o uso do sêmen sexado em sistemas PIV (UNDERWOOD et al., 2010; GOSÁLVES et al., 2011).

Uma outra abordagem promissora é a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), que oferece uma última solução para o uso do sêmen sexado na PIV, porque um

espermatozoide pode ser usado para fertilizar um oócito (XU et al., 2009). O sêmen sexado poderia ser usado para ICSI com eficiência similar ao sêmen não-sexado (HAMANO et al., 1999). Contudo, o uso da ICSI em bovinos enfrenta dificuldades, pois há uma limitada habilidade para se iniciar a liberação e oscilação dos íons cálcio, e com isso induzir a ativação dos oócitos, e este fato parece comprometer o sucesso da ICSI nesta espécie (MALCUIT et al., 2006). Diante disso, recentes pesquisas tem sido conduzidas na tentativa de se promover uma maior otimização da ICSI em bovinos. Bevacqua et al. (2010) obtiveram altas taxas de desenvolvimento de blastocistos usando oócitos quimicamente ativados. Estes fatos demonstram que a ICSI, no futuro, poderá evitar os problemas do alto custo com as doses e as baixas concentrações espermáticas usadas com a aplicação do sêmen sexado.

2.6 Panorama da Produção *In Vitro* de Embriões

Segundo Stroud e Bó (2011) em todo mundo em 2009, o número de embriões produzidos *in vivo* foi de 704.000 e 379.000 embriões produzidos *in vitro*. O Brasil mais uma vez lidera o campo global de produção e transferência de embrião *in vitro*, havendo um aumento de 12,7% na produção de embriões produzidos *in vitro* em comparação a 2008. Para investigar a razão pela qual a técnica preferida para a produção de embriões de bovinos no Brasil mudou de *in vivo* para *in vitro*, Pontes et al. (2009) compararam estas duas abordagens em vacas *Bos taurus indicus* (Nelore). Os autores constataram que entre os métodos *in vivo* e *in vitro* para produção de embriões, e com um intervalo de 15 dias entre procedimentos de OPU, foi possível produzir mais embriões e com isso mais prenheses em relação ao método *in vivo* de produção de embrião.

Vinte e cinco anos após o nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro* as taxas de blastocistos ainda estão aquém do desejado, variando entre 20 e 50 % (média de 35 %). Além da baixa eficiência da técnica, os embriões que conseguem se desenvolver *in vitro* apresentam qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo* (GONÇALVES et al., 2008a). Além disso, embriões produzidos *in vitro* têm sido frequentemente associados a anormalidades fetal e neonatal (FARIN et al., 2006) além de apresentarem baixa viabilidade após a criopreservação lenta.

Segundo Lonergan e Fair (2008), a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto raramente é superior a 40% e os que chegam nesta fase, são muitas vezes comprometidos em termos de qualidade e competência. Considerando que as taxas de blastocistos bovinos oriundos de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* têm permanecido baixas, mais estudos são necessários para otimização dos resultados (CASTILHO, 2009).

2.7. Influência da Raça na Produção *In Vitro* de Embriões

Diversas raças têm sido utilizadas para PIV. Embora seja descrito que a fertilidade entre raças bovinas pode variar, poucos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar as variações entre as raças, sendo difícil a comparação pela diversidade de métodos utilizados (SENEDA *et al.*, 2002). O fator individual tem sido apontado como de grande importância na competência dos oócitos para o desenvolvimento, apesar das variações pertinentes à raça, idade e condição corporal (BOLS *et al.*, 1997).

Os dados sobre dinâmica folicular em bovinos são conflitantes, isso porque existem ainda poucos estudos para se estabelecer um padrão para as diferentes raças em diferentes locais geográficos e diferentes manejos. Com o auxílio da ultrassonografia os estudos estão sendo esclarecedores a respeito da função ovariana, melhorando os programas de manejo reprodutivo do rebanho (MARTINS, 2005). Animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral, apresentam um maior número de folículos nos ovários, em comparação com vacas de raças européias, com médias variando entre 18 e 25 oócitos recuperados por sessão de OPU (WATANABE *et al.*, 1999). Esta grande população de folículos nesta raça é presente sem o uso de hormônios exógenos ou protocolos de sincronização. Apesar da importância fisiológica dessas diferenças, o elevado número de oócitos obtidos pela OPU parece ser uma característica exclusiva de vacas Nelore (PONTES *et al.*, 2009).

A fertilidade entre as raças na produção *in vitro* de embriões bovinos pode variar. Abraham *et al.* (2010) objetivaram determinar a influência da raça da doadora de oócitos sobre o desenvolvimento de embriões após a MIV, FIV e CIV. Os autores compararam animais das raças Sueco Vermelho e Branca (SRB), Sueco Holandesa (SLB) e raças de corte mestiças, e constataram que as taxas de clivagem e o percentual de embriões desenvolvidos além de duas células não diferiram entre as raças de corte mestiças e SRB, sendo que SLB foi significativamente maior do que as demais raças. Não houve diferenças significativas entre as raças quanto à qualidade de blastocistos e o percentual de blastocistos desenvolvidos após 8 dias, mas o número de células no 8º dia de blastocistos foi significativamente menor no SLB, evidenciando que a raça das doadoras de oócitos influencia o desenvolvimento durante a produção *in vitro* de embriões.

Scherthaner (1999) realizou um estudo comparando a taxa de prenhez na PIV usando 36 vacas de diferentes raças (21 Simental, 5 Holandesa-Frísia, 5 Pardo Suíço e 5 Charolês). Em média, foram recuperados cinco oócitos por sessão. Após a MIV, FIV e CIV, obteve-se 0,8 embriões por sessão de OPU. No total foram transferidos 397 embriões, sendo que 125 prenheses foram estabelecidas. A comparação das diferentes raças de doadoras revelou diferenças significativas no número de oócitos, embriões produzidos e prenheses estabelecidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Período e Local de Obtenção dos Dados

Este estudo foi conduzido entre agosto de 2010 e agosto de 2011, utilizando-se dados fornecidos por uma Central de Reprodução Assistida de Bovinos (laboratório *In Vitro* – Rio) localizada na fazenda Boa Vista em Barra do Piraí, Rio de Janeiro, Km 259 da BR 393 e que trabalha com programa comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos.

3.2 Animais

Foram utilizados dados referentes a fêmeas bovinas adultas doadoras de oócitos das raças Holandesa e Gir, com idade variando entre dois e sete anos, procedentes de diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro e de Minas Gerais. Esses animais foram mantidos sob diferentes condições de manejo de acordo com cada propriedade.

3.3 Aspiração Folicular, Manipulação e Classificação dos CCOs

As aspirações foliculares foram realizadas na fazenda dos proprietários destes animais, sempre pelo mesmo Médico Veterinário. As doadoras não foram submetidas a nenhum tipo de protocolo hormonal, sendo utilizados apenas animais livres de problemas reprodutivos e sem nenhuma anomalia genital, os quais passaram por avaliação ginecológica pelos Veterinários da empresa *in vitro*-Rio. Apenas foram aspiradas doadoras com escore corporal classificado como 3 ou 4 (escala variando de 1 a 5 (FERREIRA, 2010)).

As doadoras foram contidas em tronco e tiveram a região perineal devidamente higienizada com água e sabão. Após a higienização, uma anestesia epidural com 3,0 a 5,0 ml de Lidocaína a 2 % (Bloc®) foi realizada para diminuir o peristaltismo e o desconforto durante o procedimento de aspiração. Para OPU foi utilizado um aparelho de ultrassom (MINDRAY DP 2200Vet) e uma probe convexa de 5 MHz adaptada a uma guia para a aspiração folicular transvaginal. Para realização da punção folicular, foi utilizada agulha hipodérmica descartável (50 x 9 mm comprimento, Terumo®) conectada a um tubo cônico de 50 ml (Corning, USA) por uma mangueira de silicone de 0,8 m e diâmetro interno de 2 mm, acoplada a uma bomba à vácuo (Cook – com pressão ajustada para 68 mmHg). A guia de aspiração foi inserida na vagina do animal e posicionada junto ao fórnix, até que, com auxílio da palpação retal, uma imagem satisfatória dos ovários fosse obtida para que os folículos fossem aspirados. O líquido folicular contendo os CCOs foi recolhido no tubo cônico coletor contendo solução de PBS com heparina, mantida a 37°C. Após a aspiração, o conteúdo de cada tubo cônico foi despejado em filtro para colheita de embriões (WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada) e lavado com solução fisiológica acrescida de 1 % de Soro Fetal Bovino até que o meio aspirado se tornasse translúcido. O conteúdo do filtro foi vertido em placa de Petri para realização da procura, manipulação, lavagem e avaliação morfológica dos CCOs com o auxílio de um estereomicroscópio. A avaliação morfológica foi realizada segundo LEIBFRIED e FIRST (1979) levando em consideração características das células da granulosa e do citoplasma do oócito. Foram considerados viáveis apenas CCOs classificados como graus I, II e III, os quais foram encaminhados ao laboratório da empresa *In Vitro*- Rio, enquanto os demais (desnudos, cumulus expandidos, atrésicos ou degenerados) foram descartados.

3.4 Produção *In Vitro* dos Embriões, Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foram coletados dados referentes a 500 OPUs em doadoras da raça Holandesa e 500 em doadoras da raça Gir. Foram analisados o número de oócitos recuperados e o número de oócitos viáveis além das taxas de aproveitamento de oócitos, de clivagem e de blastocisto. No laboratório, localizado na Fazenda Boa Vista, os CCOs passaram pelas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* e no oitavo dia, os embriões classificados como viáveis foram envasados em palhetas de 0,25 ml para serem inovulados. Durante a etapa de cultivo *in vitro*, foi analisado também o efeito do touro nas taxas de clivagem e de blastocisto. Para tanto, foi utilizado sêmen sexado para obtenção de fêmea, de touros das raças Holandesa e Gir. Os dados foram coletados de arquivos armazenados em pastas na sala da empresa *In Vitro*- Rio, sendo estas informações organizadas e inseridas em uma planilha do programa “Microsoft Office Excell 2007”.

As 1000 aspirações foliculares foram separadas por grupo de raça da doadora (Holandesa, n= 500 e Gir, n =500) (delineamento inteiramente ao acaso) e por cruzamento: Grupo 1: doadora Holandesa com sêmen de touro Holandês (n=250); Grupo 2: doadora Holandesa com sêmen de touro Gir (n=250), Grupo 3: doadora Gir com sêmen de touro Holandês (n=250) e Grupo 4: doadora Gir com sêmen de touro Gir (n=250). No total, cinco variáveis foram analisadas (oócitos recuperados, oócitos viáveis, taxa de aproveitamento (oócitos viáveis/ oócitos recuperados), taxa de clivagem (embriões clivados/oócitos viáveis) e taxa de blastocisto (blastocisto/ oócitos viáveis). No quadro 2 está representado o esquema de organização das doadoras e do touro.

Quadro 2. Delineamento experimental.

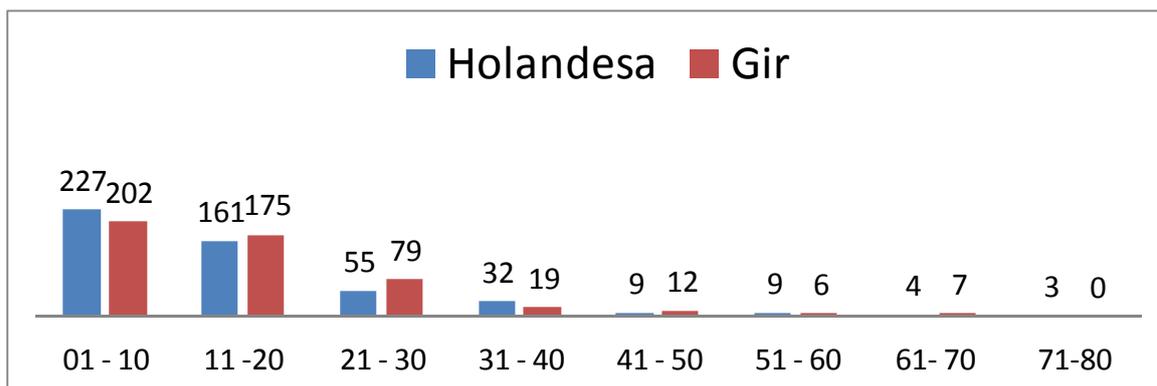
Variável Analisada		Doadora de oócito sessão/OPU	Touro
Variável 1	Oócitos recuperado	Holandesa (n=500) Gir (n=500)	
Variável 2	Oócitos viáveis	Holandesa (n=500) Gir (n=500)	
Variável 3	Taxa de aproveitamento	Holandesa (n=500) Gir (n=500)	
Variável 4	Taxa de clivagem	Holandesa (n=250) Gir (n=250)	Hôlandês (n=250) Gir (n=250)
Variável 5	Taxa de blastocisto	Holandesa (n=250) Gir (n=250)	Hôlandês (n=250) Gir (n=250)

A análise estatística usada para os dados comparativos entre raças quanto a média de oócitos recuperados e de oócitos viáveis foi o teste 't' não pareado. Para as taxas de aproveitamento, de clivagem e de blastocisto foi usado o teste qui-quadrado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

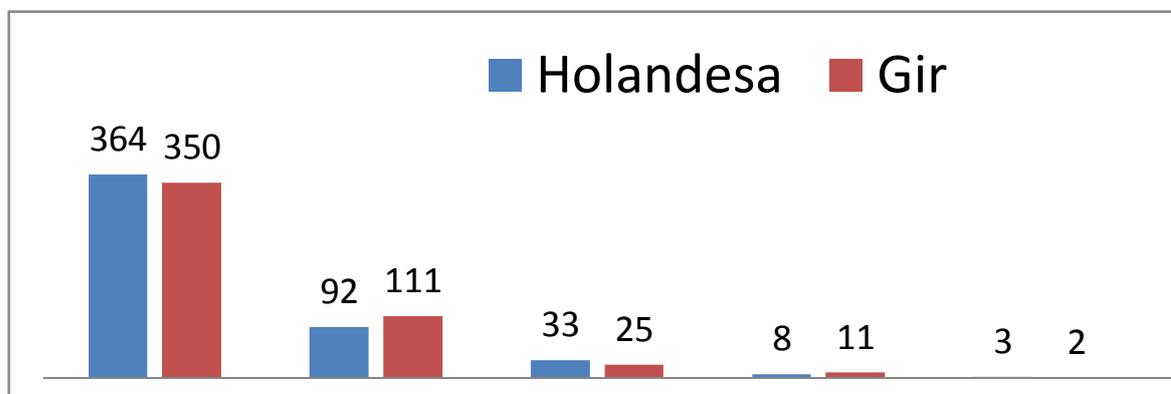
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Histogramas 1 e 2 representam o número de oócitos recuperados e o número de oócitos viáveis de acordo com a raça da doadora.

Histograma 1: número de oócitos recuperados em doadoras das raças Holandesa e Gir.



Histograma 2: número de oócitos viáveis em doadoras das raças Holandesa e Gir.



A Tabela 2 apresenta as médias e os respectivos desvios padrão de oócitos recuperados, de oócitos viáveis e a taxa de aproveitamento dos oócitos de acordo com a raça da doadora. Para as raças Holandesa e Gir, foram recuperados em média $15,14 \pm 13,08$ e $15,57 \pm 11,9$ oócitos, respectivamente, dos quais, $8,74 \pm 7,67$ e $9,12 \pm 7,97$ foram classificados como viáveis. Não houve diferença estatística em relação aos oócitos recuperados quando comparadas as duas raças ($P > 0,05$). No entanto, a raça Gir proporcionou um número médio de oócitos viáveis significativamente maior do que a raça Holandesa ($P < 0,05$). Em relação à viabilidade das estruturas recuperadas, as taxas de aproveitamento de oócitos para as raças Holandesas e Gir foram 57,73% e 58,57%, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os genótipos ($P > 0,05$).

Tabela 2. Média de oócitos recuperados, de oócitos viáveis e a taxa de aproveitamento de oócitos de acordo com a raça da doadora.

Parâmetros analisados	Holandesa	Gir
Oócitos recuperados (Média \pm DP)	$15,14 \pm 13,08^a$	$15,57 \pm 11,9^a$
Oócitos viáveis (Média \pm DP)	$8,74 \pm 7,67^a$	$9,12 \pm 7,97^b$
Taxa de aproveitamento de oócitos (%)	57,73 ^a	58,57 ^a

Letras sobrescritas diferentes dentro da mesma linha apresentam diferença estatística ($P < 0,05$).

DP = desvio padrão

No presente estudo não houve diferença estatística entre as raças em relação ao número de oócitos recuperados por doadora. Pontes et al (2010), ao realizarem 1138 sessões de OPU em doadoras Holandesas e 3778 em doadoras Gir, obtiveram médias de $11,4 \pm 3,9$ e $17,1 \pm 4,5$ oócitos recuperados por doadora respectivamente, verificando que doadoras da raça Gir apresentaram maior número de oócitos recuperados por sessão de OPU. Assim como Grázia et al (2012) que também encontraram uma média maior de oócitos recuperados em doadoras da raça Gir quando comparado com doadoras da raça Holandesa ($16,3 \pm 1,0$ e $10,6 \pm 0,7$), respectivamente. Segundo Baruselli et al (2007), os animais *Bos taurus indicus* apresentam naturalmente maior número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular. Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de OPU-PIV, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre as taurinas.

Roth et al. (2008) ao avaliarem doadoras da raça Holandesa em alta lactação, média lactação e em novilhas obtiveram médias de $16,0 \pm 2,0$; $17,2 \pm 0,9$ e $13,2 \pm 1,8$ oócitos recuperados por doadora respectivamente, não verificando diferenças entre o número médio de oócitos recuperados por vaca ao longo das sessões experimentais.

Zago (2011) em recente estudo usando doadoras *Bos taurus taurus* das raças Flamengo e Holandesa, após 20 seções de OPU/raça, verificaram que o número total de oócitos viáveis e a média de oócitos/animal/seção na raça Flamengo ($n=635$ e $8,0 \pm 0,7$) foram superiores à raça Holandesa ($n=543$ e $7,3 \pm 0,7$), respectivamente. No entanto, a taxa de recuperação de oócitos pode apresentar variação de estudo para estudo, principalmente em fêmeas *Bos taurus taurus* (SENEDA et al., 2001).

A raça Nelore, que também é uma raça pertencente ao grupo genético *Bos taurus indicus*, demonstrou uma grande diferença em relação à média de número de oócitos recuperados em relação à raça Gir. Pontes et al. (2011), ao realizarem 317 sessões de OPU, relataram uma média de $30,84 \pm 0,88$ oócitos recuperados por doadora. Considerando-se uma melhor eficiência na coleta de oócitos quando aspirando pequenos folículos, mais ondas foliculares resulta em uma maior probabilidade de encontrar pequenos folículos em animais com três contra duas ondas foliculares (SENEDA et al, 2001). Animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral, apresentam um maior número de folículos nos ovários, em

comparação com vacas de raças européias, com médias variando de 18 a 25 oócitos recuperados por sessão de OPU (WATANABE et al., 1999).

No presente estudo, a média de oócitos viáveis obtidos através das aspirações por OPU apresentou-se diferente entre as raças Holandesa e Gir. Para a raça Holandesa obteve-se uma média $8,74 \pm 7,67$ de oócitos classificados como viáveis, sendo este número menor do que o obtido com a raça Gir ($9,12 \pm 7,97$). Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Estes resultados corroboram outros na literatura, como Pontes et al (2010) que, ao compararem a média de oócitos viáveis por sessão de OPU por doadora das raças Gir e Holandesa, também verificaram que a raça Gir apresenta maior número de oócitos viáveis em relação a raça Holandesa ($12,1 \pm 3,9$ vs $8,0 \pm 2,7$, respectivamente). Assim como Grázia et al (2012) que também verificaram média maior de oócitos classificados como viáveis na raça Gir em relação a raça Holandesa ($10,6 \pm 0,7$ vs $6,4 \pm 0,4$).

Pontes et al (2011), ao analisarem outra raça zebuína (Nelore), obtiveram médias de oócitos classificados como viáveis de $23,35 \pm 0,72$, os mesmos sugerem que ainda não está claro por que doadoras Nelore produzem mais oócitos que as doadoras taurinas, talvez a taxa de atresia folicular seja menor em vacas da raça Nelore.

Lopes et al. (2006), ao realizarem estudos com doadoras taurinas agrupadas em duas categorias (menos de sete e maior do que sete oócitos), concluíram que as doadoras que produziam mais do que sete oócitos forneciam oócitos de melhor qualidade do que aquelas doadoras que produziam menos de sete oócitos. Porém, Boni et al (2002) demonstraram que em vacas, não é só a classificação morfológica dos COCs que está relacionado com a competência de desenvolvimento, mas também outros fatores, como o transporte de Ca^{2+} na membrana plasmática (nos oócitos imaturos) e o armazenamento de cálcio (em oócitos maduros).

A taxa de aproveitamento encontrada neste estudo não diferiu entre os grupos genéticos, contrariando alguns trabalhos recentes encontrados na literatura. Ratto et al (2011), em seus estudos aspirando 17 doadoras da raça Holandesa e 32 da raça Aberdeen, verificaram que a taxa de aproveitamento e a proporção dos CCOs submetidos à MIV foram maiores na raça Aberdeen do que na raça Holandesa, concluindo que a raça interfere no aproveitamento dos oócitos. Tamassia et al (2003) também verificaram a influência da raça doadora de oócitos ao comparar a taxa de oócitos recuperados após realizar repetidas sessões de OPU sobre as mesmas vacas de diferentes origens genéticas. Estes autores mostraram uma variação distintiva no número de oócitos recuperados por punção folicular por vaca, permitindo a classificação de algumas vacas sistematicamente como 'boas' ou 'ruins' produtoras de oócitos. Ratto et al (2011) relataram em seus estudos que a qualidade e a competência do CCO não é influenciada pelo estado fisiológico de prenhez da vaca doadora, e sim pela eficiência das coletas dos CCOs e da produção de embriões, sugerindo alta variação entre raças.

Merton et al. (2009) investigaram os fatores genéticos que influenciam o resultado de OPU-PIV e relataram uma menor variabilidade dos resultados na OPU-PIV em novilhas de irmãos completos do que entre os animais não relacionados geneticamente. Ainda neste estudo, Merton et al. (2009) demonstraram que as correlações genéticas foram de acordo com as fenotípicas, confirmando a sugestão de que o CCO de qualidade é independente do número total de CCOs coletados através de OPU. Esta é uma descoberta importante, pois a qualidade do CCO irá resultar em uma maior proporção de embriões produzidos.

A Tabela 3 apresenta as taxas de clivagem (embriões clivados/oócitos viáveis) e de blatocisto (embriões no estágio de blastocisto/oócitos viáveis) de acordo com a raça da doadora, usando sêmen sexado para obtenção de fêmea de touro Holandês e Gir para ambas as raças. Para a raça Holandesa usando sêmen de touro Holandês (G1) e Holandesa com sêmen Gir (G2), as taxas de clivagem foram de 65,79 e 60,36 %, respectivamente, e para a raça Gir usando sêmen de touro Holandês (G3) e Gir com sêmen Gir (G4), as taxas foram 59,67 e 56,54 %,

respectivamente. Já as taxas de blastocisto foram de 28,18 e 33,34 % para G1 e G2, e 26,82 e 31,09% para G3 e G4 respectivamente. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) na taxa de clivagem em todos os parâmetros analisados, exceto entre o G2 vs G3. Em relação a taxa de blastocisto, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos G1 vs G3 e G2 vs G4, havendo diferença estatísticas entre os demais grupos.

Tabela 3. Taxa de clivagem e de blastocisto de acordo com a raça da doadora de oócito e do touro .

Doadora	Touro	Taxa de clivagem (%)	Taxa de blastocisto (%)
(G1) Holandesa	Holandês	65,79 ^a	28,18 ^a
(G2) Holandesa	Gir	60,36 ^{bc}	33,34 ^b
(G3) Gir	Holandês	59,67 ^{bc}	26,82 ^{ac}
(G4) Gir	Gir	56,54 ^d	31,09 ^{bd}

Letras sobrescritas diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença estatística ($P < 0,05$).

Em estudo semelhante, Grázia et al (2012), ao compararem as taxas de clivagem de matrizes Holandesa com touro Holandes (G1), Gir com Gir (G2), Holandesa com Gir (G3) e Gir com Gir (G4) encontraram taxas de clivagem semelhantes entre os grupos G2 e G4 (86,6% e 87,2%; $p > 0,05$) e superiores ao G1 (82,8%; $p < 0,05$), que por sua vez foi superior ao G3 (61,3%; $p < 0,05$), concluindo que a raça Gir tem as melhores taxas independente da raça do touro.

Zago (2011), ao comparar a raça Flamengo e Holandesa usando sêmen de touro Holandes obtiveram diferença nas taxas de clivagem entre as raças estudadas. No estudo de Zago (2011) a raça Flamengo apresentou taxa de clivagem de 49,6 % e a raça Holandesa 32,8 %. As baixas taxas de clivagem da raça Holandesa no estudo de Zago (2011) parecem estar associadas a uma menor quantidade de oócitos de excelente a boa qualidade. Ratto et al. (2011) também relataram diferença na taxa de clivagem ao analisarem duas raças diferentes, Holandesa e Angus, constatando que a proporção de embriões clivados foi maior na raça Holandesa, porém a proporção de blastocistos em desenvolvimento e o número médio total de blastocistos por doadora por sessão foram significativamente maiores na raça Angus.

Nabhan et al. (2012), ao utilizarem oócitos da raça Holandesa Preto e Branco (HPB) com sêmen de touro Gir, obtiveram taxa de clivagem de 57,8 % \pm 6,4, relatando que, ao realizarem este estudo, a taxa de clivagem na raça HPB foi inferior a obtida nas demais raças estudadas (Nelore x Nelore; HPB x Angus e HPB x Brahman), sendo que a raça Nelore proporcionou os melhores resultados, constatando assim, que existe o efeito da raça nas etapas da PIV.

Satrapa et al. (2011), ao avaliarem a taxa de clivagem de oócitos de doadoras das raças Nelore com sêmen de touro Nelore, Holandesa com sêmen de touro Holandês e Holandesa com sêmen de touro Gir, verificaram que animais zebuinos (Nelore x Nelore) proporcionaram maior taxa de clivagem (93,7 \pm 1,5 %) quando comparado com Holandês x Holandês (76,1 \pm 2,3 %) e Holandês x Gir (67,2 \pm 7,2 %), porém, não houve diferença significativa na taxa de clivagem e na produção de mórula e de blastocisto entre embriões Holandês x Holandês e Holandês x Gir, concluindo que a raça da origem de oócitos mais importante do que a raça da origem do touro. Palma e Sinowatz (2004), ao utilizarem sêmen de 63 touros diferentes da raça Simental na PIV também não encontraram diferença entre a taxa de clivagem quando compararam o efeito do touro. Segundo Waksmundzka et al. (1984), a formação de embriões

normais com a capacidade de se desenvolver a termo depende tanto de oócitos quanto de espermatozoides. Ambos os componentes parentais influenciam as características do embrião recém-formado, no entanto, o citoplasma do embrião precoce é composto quase inteiramente do citoplasma do oócito. Como uma importante contribuição para o desenvolvimento embrionário, o ooplasma contém os elementos necessários para o desenvolvimento embrionário precoce e um programa intrínseco citoplasmático que regula o desenvolvimento embrionário inicial. Este gameta impõe assimetria sobre a herança de fatores citoplasmáticos resultantes em predominância generalizada de herança materna de organelas, proteínas, transcrições de RNA e outros fatores.

Looney et al. (1994) não encontraram diferença significativa entre doadoras de oócitos de raças leiteiras (84 doadoras) e de corte (116 doadoras), obtendo taxa de clivagem de 46,5 % e 40,5 %, respectivamente. Os estudos da PIV relacionados ao efeito da raça, tanto da doadora quanto do touro, ainda precisam ser mais elucidados, sendo que muitos destes estudos ainda são recentes e são sujeitos à variações que ocorrem entre os laboratórios, técnicos e manejo.

Ramos et al. (2006), ao avaliarem a raça doadora Gir com touro Gir e o uso de estimulação hormonal com FSH na aspiração, obtiveram taxa de clivagem de 56,02 %, sendo que o FSH poder alterar o ambiente folicular ao redor do oócito, influenciando direta ou indiretamente em sua qualidade (ROTH et al., 2002).

Com relação à taxa de blastocisto, também foram encontradas no presente estudo diferenças estatísticas entre as raças estudadas, porém entre os grupos G1 vs G3 e G2 vs G4 não houve diferença estatística. Em semelhante estudo, Grázia et al. (2012), ao compararem as taxas de conversão (total de embriões/ total de COOs viáveis) de matrizes Holandesas com touro Holandês (G1), Gir com Gir (G2), Holandesa com Gir (G3) e Gir com Holandês (G4) encontraram maior taxa de blastocisto em G2 e G4 em relação ao G1 e G3 (61,3 e 61,6% vs. 38,2 e 32,8%), concluindo que a maior proporção de embriões em animais da raça Gir está associada a uma maior qualidade e potencial de desenvolvimento *in vitro*, independente da raça do touro.

Ratto et al. (2011), em seus estudos usando 17 doadoras da raça Holandesa e 32 da raça Aberdeen, verificaram que a proporção de blastocistos em desenvolvimento e o número médio total de blastocistos por doadora por sessão foram significativamente maiores na raça Aberdeen. Além disso, o número de blastocistos que se desenvolveu em relação ao total de embriões clivados foi significativamente diferente entre as duas raças, sendo 202 / 494 (40,9 %) e 720 / 1287 (55,9 %) para as doadoras Holandesa e Aberdeen, respectivamente. Em conclusão, os autores relataram que os resultados de seu estudo indicam que as taxas de recuperação de CCOs e produção de blastocistos são afetadas pela raça da doadora, o que está de acordo com o presente estudo. Schernthaner *et al.* (1999), ao trabalharem com 36 vacas, sendo 21 Simmental, 5 Holandesa, 5 Pardo-Suíço e 5 Charolês realizando aspiração folicular duas vezes por semana, sugerem que a produção de bezerros através de oócitos coletados por OPU com subsequente produção *in vitro* de embriões é influenciada pela raça da vaca doadora, sendo que, em seu estudo, a raça Charolesa mostrou os melhores resultados em relação à todos os parâmetros avaliados. Já as raças Pardo-Suíço e Holandesa mostraram resultados inferiores em relação ao número de folículos, oócitos recuperados e oócitos viáveis por sessão de punção folicular. Tamassia et al. (2003), avaliando a influência da raça da doadora de oócitos na taxa de blastocistos, utilizando repetidas sessões de OPU, mostraram uma variação na produção de blastocistos, com vacas que mostravam um fenótipo de 'bom' ou 'ruim' com relação à produção de blastocistos, e constataram ainda que o sêmen utilizado não influenciou a taxa de blastocisto, revelando uma influência materna no desenvolvimento de embriões bovinos.

Satrapa et al. (2011), ao avaliarem a taxa de blastocisto de oócitos de doadoras das raças Nelore com sêmen de touro Nelore, Holandesa com sêmen de touro Holandês e Holandesa com sêmen de touro Gir, verificaram que animais zebuínos (Nelore x Nelore) proporcionaram maior taxa de blastocisto ($34,7 \pm 3,6$ %) quando comparados com Holandesa x Holandês ($9,4 \pm 1,3$ %) e Holandesa x Gir ($10,4 \pm 0,2$ %), porém, estes autores não encontraram diferenças significativas na produção de blastocistos entre embriões Holandesa x Holandês e Holandesa x Gir, sendo estes dados diferentes deste estudo, onde houve diferença entre as raças Holandesa e Gir. No estudo de Satrapa et al. (2011), o oócito desempenhou um papel mais importante do que o do touro no desenvolvimento embrionário de doadoras da raça Holandesa. Alguns estudos sugerem que as taxas de clivagem e de blastocisto para fêmeas *Bos taurus taurus* são comparáveis às taxas obtidas com fêmeas *Bos taurus indicus* com divergências de resultados, estando mais provavelmente relacionadas à qualidade oocitária do que ao fator racial (PONTES et al., 2010 e ZAGO, 2011). Também segundo Satrapa et al. (2011), a raça de origem de oócitos é mais importante do que a raça do touro. A influência materna na produção de oócitos e na produção *in vitro* de blastocisto bovinos ainda permanece indeterminado. Foi sugerido que vacas com variado histórico genético têm diferentes capacidades para produzir oócitos por punção folicular, e que os seus oócitos têm diferentes níveis de competência para a produção *in vitro* de embriões (TAMASSIA et al., 2003).

5 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente trabalho, é possível concluir que:

- A raça da doadora não interfere no número de oócitos recuperados assim como em sua taxa de aproveitamento.
- A raça da doadora de oócitos e a do touro influenciam as taxas de clivagem e de blastocisto na PIV de embriões bovinos.
- O uso do cruzamento doadora Holandesa e touro Gir foi o mais eficiente para produção de embriões mestiços F1.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M.C.; RUETE, A.; BRANDT, Y.C.B. Breed influences outcome of *in vitro* production of embryos in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Proceedings of the annual conference of the International Embryo Transfer Society, Córdoba, Argentina, 9-12 January 2010. v.22.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180-187, 2010.
- ALMEIDA, R.G.; ROSSI, T.C.; MACEDO, G.G.; WATANABE, Y.F. Avaliação do efeito da sazonalidade no desempenho de fêmeas bovinas da raça Brahman na produção de embriões produzidos *in vitro* (PIV) na colômbia. **XV Congresso Mundial da Raça Brahman**, Uberaba, MG, Brasil. 17-24 de Outubro de 2010. *Anais*
- APPARÍCIO, M.; MOSTACHIO, G.Q.; MOTHEO, T.F.; PADILHA, L.; ALVES, A.E.; PIRES-BUTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R. Maturação *in vitro* de oócitos caninos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.16-25, 2011.
- 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, 2011.
- AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 93 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2004.
- BAINBRIDG, D.R.J.; CATT, S.L.; EVANS, G.; JABBOUR, H.N. Sucesso na fertilização *in vitro* de oócitos maturados *in vivo* em aspirados por laparoscopia de cervas veados (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, v.51, p.891-898, 1999.
- BALL, P.J.H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p.
- 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. **Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.205-211, 2007.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v.1, p.91-148, 1995.
- BEVACQUA, R.J.; PEREYRA-BONNET, F.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; SALAMONE, D.F. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. **Theriogenology**, v.74, p.922-931, 2010.
- 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.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

- BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M., VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, p.677-687, 1995.
- BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p.1001-1014, 1996.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, Stoneham, v.47, p.1221- 1236, 1997.
- BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus–oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. **Biology of Reproduction**, v.66, p.836-842, 2002.
- 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, B.G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.
- CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-75, 2008.
- 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.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nellore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.189-96, 2006.
- CASTILHO, C.; RENESTO, A.; GARCIA, J.M.; MUSTAFA, F.C.; SILVA, J.O.F.; COELHO, L.A. Associação da MOET e *opu-piv* na produção de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira (UFG)**, v.10, p.248-254, 2009.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr., I.L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.35, p.120-122, 1998.
- CRAN, D.G.; JOHNSON, L.A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, London, v.136, p.495-496, 1005.
- DE VRIES, A.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.847-856, 2008.

- DEL CAMPO, M.R., DEL CAMPO, C.H., ADAMS, O.P., MAPLETOFT, R.J., The application of new reproductive technologies to South American camelids. **Theriogenology**, v.43, p.21–30, 1995.
- DULCIBELLA, T.; DUFFY, P.; REINDOLLAR, R.; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p.870-876, 1990.
- FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178–91, 2006.
- 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, E.M; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p.172-181, 2008. Disponível em www.cbra.org.br; acesso em: 23/02/2011.
- FERREIRA, E.M; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.
- FIGUEIREDO, R.A; BARROS, C.M; PINHEIRO, O.L; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489–505, 1997.
- GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C.; BARROS, C.M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, p.201-210, 1998.
- GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, 1, 2005, Londrina, PR. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**. Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultrassonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.210, 2005 (Resumo).
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.187-200, 1989.a
- GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.b
- GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.41, p.247-254, 1989.c
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, p.638-647, 2001.
- GOESEELS, S.B. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.66, p.297-306, 2006.
- GONÇALVES, P.B.D. Transferência e Criopreservação de embriões Bovinos. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002; cap. 8, p.127-178.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SIQUEIRA, L.C.; ANTONIAZZI, A.Q. Biotecnologias da Reprodução Animal-Produção *in vitro* de Embriões Bovinos, **Ciência veterinária trópica**, Recife-PE, v. 11, p.135-138, 2008a.

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

GONZÁLEZ, F.H.D. **Hormonioterapia na reprodução**: p. 18. 2002. Disponível em: < www.ufrgs.br/favet/bioquimica.18p.2002. Acessado em 1 de outubro de 2010

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-se doadoras das raças GIR (*Bos taurus indicus*) ou Holandesa (*Bos taurus taurus*). **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 30-2 de setembro de 2012. Foz do Iguaçu, PR, Brasil. *Anais*

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo, Brasil: Manole, 7ed, 2004; 513p.

HAMANO, K.; LI, X.; QIAN, X.; FUNAUCHI, K.; FURUDATE, M.; MINATO, Y. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1194-1197, 1999.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Segundo IBGE, rebanho bovino volta a crescer. Internet: Google. Disponível em: <http://www.novabrazilfm.com.br/noticias/nova-noticia/segundo-ibge-rebanho-bovino-volta-a-crescer/>. Acesso em: 03/05/10.

KATSKA, L., SMORAG, Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.451-460, 1984.

LANE, M.; GARDNER, D.K.; HASLER, M.J.; HASLER, J.F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v.60, p.407-419, 2003.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos - Dealing with the warts; **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p.137-52, 2006.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D. L. Comercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v.41, p.7-72, 1994.

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.

LOPEZ RUIZ, L., ALVAREZ, N., NUNEZ, I., MONTES, I., SOLANO, R., FUENTES, D., PEDROSO, R., PALMA, G. A., BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.292, 1996 (Abstrat).

- 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.
- LUCIA, R.F.S.; MARTINEZ, A.C. Efeito da sazonalidade na produção de oócitos de vacas brahman submetidas à aspiração folicular. XV **Congresso Mundial da Raça Brahman**, 17-24 de Outubro de 2010. Uberaba, MG, Brasil. *Anais*.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-26, 1992.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, RUMPF, M.M. R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-1297, 2009.
- MALCUIT, C.; MASERATI, M.; TAKAHASHI, Y.; PAGE, R.; FISSORE, R.A. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal $[Ca^{2+}]_i$ responses and oocyte activation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.39-51, 2006.
- MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.16, p.127-41, 1994.
- MARTINS, A.C. **Dinâmica Folicular em Bovinos**. 20f. (Seminário em Reprodução Animal I) Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal, Curso de Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP –Câmpus de Botucatu, 2005.
- MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; SAQLAN, S.M.S. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.141-148, 2009.
- MELLO, R.R.C. **Parâmetros reprodutivos de vacas Sindi tratadas com dois protocolos de sincronização da ovulação**. 2009. 40p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.
- 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.651-74, 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.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**, 6 ed. Porto Alegre, RS. Ed. Sulina, v.1, 1987; p. 91.
- 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.
- 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.
- NABHAN, T.; SATRAPA, R. A.; SIMÕES, R. A. L.; SILVA, C. F.; RAZZA, E. M.; PUELKER, R.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos in

vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.4, p.332-335, 2011.

NANZE, T.A.D.T. **Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução**. Disponível <http://www.girolando.com.br/site/noticia.php?id=1859>, acesso em 23/02/2011.

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.

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

PEIPPO, J.; KURKILAHATI, M.; BREDBACKA, P. Development kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v.9, p.105–113, 2001.

PEIPPO, J.; RATY, M.; KORHOMEN, K.; ERONEN, M.; KANANEN, K.; TURME, T.; HALMEKYTO, M.; MAKI-TANILA, A. Impact of *in vitro* fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. **Zygote**, v.1, p.1–10, 2010.

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

PITOMBO, L. H. Embriões com sanidade garantida. **Revista Panorama Rural**. Disponível em: <http://www.panoramamarural.com.br/popimprime.aspx?id=43>, acesso: 23/02/2011

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690–69, 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 Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.

RANDEL, R.D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal of Animal Science**, v.43, p.300, 1976 (abstract).

RAMOS, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; COSTA, E.P. Fecundação in vitro com sêmen de bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.4, 2000.

RAMOS, A.A., FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.341-347, 2006.

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

- 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 espermatozóides selecionados por *swim-up* ou gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.32-39, 2004.
- RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-77, 1995.
- 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.
- 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.
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1398-1405, 2002.
- ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, v.69, p.932-939, 2008.
- SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.94, 2005.
- SATRAPA, R.A.; NABHAN, T.; SILVA, C.F.; SIMÕES, R.A.L.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.76, p.1162-1167, 2011.
- SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G. A.; MÖDL, J.; WOLF, E.; BREM, G. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.46, p.33-37, 1999.
- SENEDA, M.M.; BLASCHI, W. Ovum Pic Up em bovinos: considerações técnicas. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**. (1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), 2004.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINE, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. **Abstracts of 14 International Congress on Animal Reproduction**, v.1, p.62, 2000.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37–43, 2001.

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

SENEDA, M.M. Aspiração bem feita. **Revista Cultivar Bovinos**, v.17, 2005. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=190>. Acesso em: 03/05/10.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308–317, 1988.

SCHWEITZER, C.M. Recuperação de espermatozoides, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.347-348, 1996.

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.

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.

STROUD, B.; BÓ, G.A. Estatísticas Mundiais de 2009 para Transferência Embrionária em Animais Domésticos de Fazenda; Resumo do Relatório da Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 18-20 de Agosto de 2011. Cumbuco, CE, Brasil. *Anais*

TAKUMA, T., SAKAI, S., EZOE, D., ICHIMARU, H., JINNOUCHI, T., KAEDEI, Y., NAGAI, T., OTOI, T. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. **Journal of Reproduction and Development**. v.56, p. 55–59, 2010.

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.

THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, v.45, p.27-40, 1996.

THOMPSON, J.G. Comparison between *in vitro*-derived and *in vitro*-produced preelongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.341-354, 1997.

THOMPSON, J.G.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; BELL, A.C.S.; LAMBERT, M.G.; TERVIT, H.R. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. **Theriogenology**, v.49, p.1239-1249, 1998.

TUBMAN, L.M.; BRINK, Z.; SUH, T.K.; SEIDEL Jr., G.E. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. **Journal of Animal Science**, v.82, p.1029-1036, 2004.

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; PEREIRA, D.C.; CASTRO, A.; THOMSON, P.C.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Theriogenology**, v.73, p.97-102, 2010.

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**, Belo Horizonte, v.32, p.100-109, 2008. Disponível em www.cbra.org.br. Acessado em 2 de outubro de 2010.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, dezembro, 2000.

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.

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.

WAKSMUNDZKA, M.; KRYSIAK, E.; KARASIEWICZ, J.; CZOŁOWSKA, R.; TARKOWSKI, A.K. Autonomous cortical activity in mouse eggs controlled by acytoplasmic clock. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.79, p. 77–96, 1984.

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

ZAGO, F.C. **Eficiência de sistemas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos da Raça Flamengo**. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), 2011.