

UNIVERSIDADE JOSÉ ROSÁRIO VELLANO

Eduardo Ramos de Oliveira

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA, PRODUÇÃO  
DE EMBRIÃO E GESTAÇÃO EM DOADORAS DA RAÇA GIR.***

Alfenas - MG

2011

EDUARDO RAMOS DE OLIVEIRA

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA, PRODUÇÃO  
DE EMBRIÃO E GESTAÇÃO EM DOADORAS DA RAÇA GIR.***

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Reprodução Animal  
como parte dos requisitos necessários  
para obtenção do título de Mestre em  
Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Co-orientador: Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

Alfenas - MG

2011

Oliveira, Eduardo Ramos de  
Avaliação do potencial de recuperação oocitária,  
produção de embrião e gestação em  
doadoras da raça Gir/.—Eduardo Ramos de Oliveira  
—Alfenas : Unifenas, 2011.  
51 f.

Orientador : Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana  
Dissertação(Mestrado em Medicina Veterinária)-  
Universidade José do Rosário Vellano.  
1.OPU 2.Bovino 3.Gir 4. Embrião I.Título

CDU: 636.2(043)

Eduardo Ramos de Oliveira

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA, PRODUÇÃO  
DE EMBRIÃO E GESTAÇÃO EM DOADORAS DA RAÇA GIR.***

Dissertação defendida e aprovada em 23 de maio de 2011, pela Comissão  
Examinadora constituída por:

-----  
Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana  
(Orientador)

-----  
Profª. Dra. Marilú Martins Gioso

-----  
Dr. Bruno Campos de Carvalho

-----  
Prof. Dr. Walter Bernes Filho  
(suplente)

## Dedicatória

Aos meus pais, minha esposa e meus  
filhos por estarem ao meu lado dando  
força para alcançar o objetivo final

## Agradecimentos

A FAPEMIG pela bolsa estudantil

Ao Professor Doutor João Henrique Moreira Viana por ter me orientado durante os dois anos de mestrado

Ao Dr. Miller pela co-orientação, ajuda na redação e análises estatísticas do experimento

A Profa. Dra. Marilu pelo incentivo e ajuda durante os dois anos de mestrado

As equipes das Fazendas que gentilmente cederam os resultados para serem analisados neste experimento:

- Biotran
- ZRB Limeira
- Gianini Agropecuaria
- Mizael Varela

E ao Laboratório de Produção de embrião in vitro da Biotran Ltda.

## SUMÁRIO

	Resumo	9
	Summary	10
	Lista de tabelas	11
	Lista de figuras	12
	Lista de fotos	13
1	Introdução	14
2	Hipóteses	15
3	Objetivo	15
4	Revisão de literatura	15
4.1	Aspiração folicular e produção in vitro de embriões	16
4.2	Dinâmica e divergência folicular	17
4.3	Perfil endócrino	19
4.4	Genética e produção de embriões	20
4.5	Reserva ovariana	21
5	Material e Métodos	22
5.1	Sincronização	22
5.2	Aspiração folicular orientada por ultrassom	23
5.3	Preparo do material	24
5.4	Avaliação morfológica dos COCs recuperados	25
5.5	Avaliação do potencial de desenvolvimento in vitro	26
5.6	Diagnostico de gestação	26

5.7	Análises estatísticas	28
6	Resultados	28
6.1	Recuperação de oócitos e qualidade	30
6.2	Produção de embrião e taxa de gestação dos embriões transferidos.	32
6.3	Distribuição dos animais e caracterização dos quartis de acordo com a recuperação total de oócitos em doadoras da raça Gir.	38
7	Discussão	42
8	Conclusão	43
9	Referências bibliográficas	44

## Resumo

OLIVEIRA, Eduardo Ramos. **Avaliação do potencial de recuperação oocitária, produção de embrião e gestação em doadoras da raça GIR.** 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2011.

A produção de embriões bovinos teve um aumento acentuado na última década. No Brasil, esse aumento foi diretamente relacionado à melhoria da produção de embriões in vitro, particularmente em rebanhos leiteiros. O presente experimento utilizou a ultrassonografia transvaginal para a aspiração de folículos ovarianos e produção in vitro de embriões em bovinos da raça Gir (raças zebuínas leiteiras) no intuito de avaliar o potencial de doadoras para a recuperação oocitária, produção de embriões e gestação. As vacas foram suplementadas com silagem de milho e concentrado à base de milho, soja, vitaminas e minerais, de acordo com as exigências nutricionais. Todos os procedimentos de aspiração foram precedidos de sincronização da onda de crescimento folicular 5 dias antes a aspiração, através de implante auricular de norgestomet, 3 mg de benzoato de estradiol e 0,530 mg de cloprostenol sódico. Dados da empresa privada (Biotran<sup>®</sup> - LTDA), recuperados dos últimos três anos foram incluídos. As aspirações foliculares foram realizadas de acordo com os procedimentos básicos: utilizou-se o dispositivo de ultrassom (Pie-Medical Esaot Akila) e um sistema de vácuo (pressão de 80 mmHg) com uma agulha descartável 20G em uma extremidade e um tubo coletor (50 ml) na outras. Somente punções com recuperação de pelo menos um oócito foram consideradas, um total de 626 sessões de aspiração de 251 animais ( $\geq 60$  dias após o parto) foram utilizados. Os oócitos recuperados foram classificados de acordo com as camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma. Utilizou-se sêmen sexado (X) da raça Gir com a fertilidade comprovada. De acordo com o total de oócitos recuperados as vacas foram ordenadas em quartis. O total de oócitos, bem como os viáveis e inviáveis, a conversão para embriões, e o número de gestações produzidas em cada sessão de punção foram comparados entre o primeiro e o quarto quartil. Os dados foram analisados por ANOVA one-way (versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Diferenças entre o primeiro e quarto quartis foram acessadas pelo teste t de Student e os dados de frequência foram avaliados pelo teste exato de Fisher. A recuperação de oócitos (Total e viáveis) e a produção de embriões, bem como o número de gestações (média  $\pm$  DP por sessão) foram maiores ( $P < 0,0001$ ) nos animais do primeiro quartil ( $41,6 \pm 10,6$  vs  $6,7 \pm 3,1$  oócitos;  $29,1 \pm 11,0$  vs  $4,5 \pm 2,7$  viáveis,  $8,6 \pm 5,7$  vs  $1,8 \pm 1,8$  embriões;) as taxas de gestação foram de 46,0% 44,9%, 43,9% e 45,6% para o I, II, III e IV quartil respectivamente. A taxa de conversão dos oócitos viáveis para embrião foi maior ( $P < 0,03$ ) em animais do quarto quartil quando comparado ao primeiro ( $51,1$  vs  $31,9\%$ ). A interpretação foi de que na raça Gir, os animais com maior potencial de recuperação oocitária produzem em média 40 oócitos viáveis e oito embriões em cada sessão do TGFa. Baseada no potencial de recuperação oocitária resulta em um aumento absoluto, mas não relativo, na produção de embriões.

Palavras -chave : OPU. Bovino. GIR.Embrião

## Abstract

OLIVEIRA, Eduardo Ramos de. **Assessment of oocyte recovery potential, production Pregnancy and embryo donors Gir.** 2011. 51 f. Dissertation ( Master's in Medicine Veterinary)-Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2011.

The production of bovine embryos had a pronounced increase in the last decade. In Brazil, this increase was directly related to the improvement of the in vitro embryo production, particularly in dairy cattle. The present experiment used the transvaginal ultrasound-guide for ovarian follicle aspiration (TGFA) and in vitro embryo production in Gyr cattle (dairy zebu breed) to assess the potential of the donator for oocyte and embryo production. Data from a private company (Biotran – Alfenas, MG - Brazil), recovered for the last three years were included in this study. Cows were supplemented with corn silage and a mixture of corn, soybean, vitamin and minerals, according to their nutritional requirements. The ovarian follicular wave was synchronized 5 days before TGFA. Briefly, auricular implant and intramuscular injections of 3 mg of estradiol benzoate and 0.530 mg of sodium cloprostenol. The TGFAs were performed according to the same basic procedures: using the ultrasound device (Pie-Medical Esaot Akila) and a vacuum system (pressure of 80 mmHg) with a disposable 20G needle in one extremity and a collector tube (50 ml) in the other. Only TGFAs with at least one oocyte recovered were considered, and a total of 178 TGFAs sessions from different Gyr cows ( $\geq 60$  days after parturition) were used. The recovered oocytes were classified according to the cumulus cells layers and cytoplasm aspect. Sex-sorted (X) semen with proved fertility was used for in vitro fertilization and embryo production. According to the total recovered oocytes the cows were ordered in one of the 4 quartiles, with the top 25% (1<sup>st</sup> quartile), the median 50% (2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup>) and the bottom 25% (4<sup>th</sup> quartile). The average of recovered oocyte (total, viable and unviable), total embryo and the number of pregnancies produced in each TGFA session were compared between the first and the fourth quartiles. Conversion rates (%) of the total and viable oocytes to embryo, viable oocytes to pregnancy and embryo to pregnancy were also performed. Data were analyzed by one-way ANOVA (9.2 Version; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences between the first and fourth quartiles were accessed by Student's t-test and frequency data were evaluated by Fisher's Exact test. The production of oocytes and embryos, and the number of pregnancies (mean  $\pm$  SD by session) were higher ( $P < 0.0001$ ) in the animals of the first quartile ( $41.6 \pm 10.6$  vs  $6.7 \pm 3.1$  oocytes;  $29.1 \pm 11.0$  vs  $4.5 \pm 2.7$  viable;  $8.6 \pm 5.7$  vs  $1.8 \pm 1.8$  embryos). The rate of pregnancy was 46.0%, 44.9%, 43.9% and 45.6% for the I; II; III and IV respective. The conversion rate of the viable oocytes to embryo was greater ( $P < 0.03$ ) in animals from the fourth quartile (51.1 vs 31.9%). The interpretation was that for Gyr breed the animals with high donator potential produce in average 40 viable oocytes and 8 embryos in each session of the TGFA. The data suggest that the selection of the animals with high potential for oocyte production can improve the absolute but not relative number of the in vitro embryos produce.

Keywords: OPU. Bovine. GIR. Embryo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Numero de animais e sessões de aspiração folicular que foram submetidos.	23
Tabela 2	Número total, média e IC do total de oócitos recuperados e classificados como viáveis e não viáveis em 626 sessões de aspiração folicular na raça Gir.	29
Tabela 3	Divisão das categorias de oócitos viáveis e desnudos, respectivamente.	31
Tabela 4	Produção média de embriões de doadoras da raça Gir por sessão de aspiração folicular	32
Tabela 5	Produção de embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento e percentual da produção total	32
Tabela 6	Número de embriões e gestações por estágio de desenvolvimento embrionário.	33
Tabela 7	Recuperação de oócitos totais e classificados como viáveis, bem como dos embriões produzidos e o percentual de gestação entre os quartis	35
Tabela 8	Percentuais de conversão para as variáveis analisadas dentro de cada quartil de recuperação oocitária.	37
Tabela 9	Recuperação de oócitos totais e classificados como viáveis, bem como dos embriões produzidos, de acordo com a ordem de coleta do grupo de animais pertencentes ao 1º quartil.	38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Resultados mais frequentes na recuperação do total de oócitos e diferentes classes (viáveis e não viáveis) de vacas Gir. As barras em destaque no eixo X evidenciam a variação do número de oócitos recuperados em cada classe. 30
- Figura 2 Percentual de oócitos em cada uma das categorias de viáveis e não viáveis. 31
- Figura 3 Distribuição do total de oócitos e aqueles classificados como viáveis e não viáveis em cada quartil separado pelo total de oócitos recuperados. 35
- Figura 4 Taxa de conversão dos oócitos recuperados de doadoras da raça Gir. Os valores são expressos em percentual de oócitos totais que produziram embriões e gestações e o percentual dos oócitos viáveis que produziram embriões e gestações 36
- Figura 5 Variação na recuperação de total de oócitos e daqueles classificados como viáveis, de acordo com a ordem de coleta em vacas da raça Gir. Total de quatro coletas no grupo de vacas pertencentes ao primeiro quartil (n=22) quanto à produção de oócitos totais. 38
- Figura 6 Variação no número de embriões produzidos de acordo com a ordem de coleta em vacas da raça Gir. Total de quatro coletas no grupo de vacas pertencentes ao primeiro quartil (n=22) quanto à produção de oócitos totais. 39

## LISTA DE FOTOS

Foto 1	Equipamentos utilizados para aspiração folicular guiada por ultrassom	25
Foto 2	Procedimento de aspiração	25
Foto 3	Equipamentos do laboratório de campo	26
Foto 4	Imagem ultrassonografica de útero não gestante	28
Foto 5	Imagem ultrassonografica de útero gestante	28

# 1 - INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma das atividades mais importantes do agronegócio mineiro. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, sendo responsável por 28% da produção nacional. A cadeia produtiva leiteira está presente em todas as regiões do estado, empregando mão de obra de aproximadamente 576 mil empregos diretos, faturando aproximadamente R\$ 2,4 bilhões e garantindo renda para parte da população<sup>1</sup>.

Para se manter nessa posição, o investimento em biotecnologias reprodutivas é de grande importância, uma vez que a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores pode possibilitar um incremento na produtividade dos rebanhos, reduzindo assim custos de produção.

Atualmente, o Brasil ocupa posição de maior produtor de embriões bovinos do mundo, particularmente pela produção de embriões *in vitro*, sendo responsável por aproximadamente 25% do total de transferências realizadas (Thibier, 2008). Segundo Viana (2010), em 2008 foram transferidos mais de 285.000 embriões. A produção de embriões *in vivo* e *in vitro* são técnicas que possibilitam aumentar o número de descendentes de animais geneticamente superiores. Entretanto, os altos custos inerentes ao processo restringe seu uso a um número limitado de rebanhos.

A população bovina no estado de Minas Gerais é constituída predominantemente por rebanhos leiteiros, nos quais 80% dos indivíduos são da raça Gir ou de seus cruzamentos, caracterizando sua importância econômica. Nos últimos cinco anos observou-se, expressivo aumento do uso da FIV na raça Gir, tanto para a produção de reprodutores e matrizes quanto para a produção de mestiços F1 (VIANA *et. al.*, 2010). Em ambos os casos, a eficiência da produção de embriões é limitada por características inerentes às doadoras, incluindo variações em características ovarianas como a reserva ovariana e o perfil de recrutamento folicular. Otimizar a produção de embriões pode contribuir para uma melhor compreensão destas características, reduzindo os custos e aumentando a eficiência dos programas. Desta forma a tecnologia poderia se tornar viável para criadores, contribuindo para uma maior produtividade e lucratividade do setor.

---

<sup>1</sup> <http://www.indi.mg.gov.br/perfil/setores/ai.html> (Mar 2009)

A produção de embriões seja *in vivo* (TE) ou *in vitro* (PIVE) é caracterizada pela inconstância nos resultados, que podem ocorrer nas diversas etapas no processo (COSTA, 2004), interferindo diretamente no resultado final. Na produção *in vitro* de embriões, estas etapas são: aspiração folicular; maturação *in vitro*; fecundação *in vitro*; cultivo e transferência dos embriões para receptoras previamente sincronizadas. Geralmente os valores médios de produção de embriões são utilizados para coordenar as etapas do programa. No entanto, os resultados em cada uma das etapas são bastante variáveis, o que dificulta a otimização do processo.

A aspiração folicular é a primeira etapa do processo e está diretamente relacionada ao resultado final do processo de PIVE. O conhecimento prévio do potencial de produção de embriões de cada doadora permitiria um melhor planejamento das atividades subsequentes, otimizando todo o processo. A preparação de receptoras, por exemplo, poderia ser melhor organizada, reduzindo gastos com receptoras não utilizadas e evitando o descarte de embriões por falta de receptoras em casos de produção acima da média geral.

Possivelmente, variações nos resultados de recuperação de oócitos estão relacionadas a diversos fatores, entre eles a raça. Segundo Seneda *et. al.* (2005), animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral, normalmente apresentam um número maior de folículos recrutados por onda, e conseqüentemente um número maior de oócitos recuperados quando comparados a vacas de raça europeia. Indivíduos de uma mesma raça também apresentam variações significativas na recuperação oocitária, que podem ser devidas a diferenças em parâmetros fisiológicos e endócrinos relacionados, por exemplo, à produção de leite e/ou manejo alimentar.

## **2 - Hipóteses**

2.1. Existe uma variação significativa na recuperação de oócitos por aspiração folicular em diferentes animais da raça Gir

2.2. A variação na recuperação de oócitos pode ser utilizada como indicativo do potencial de cada animal como doadora

2.3 A conversão de oócito para embrião e taxas de gestações podem estar relacionadas com a quantidade de oócitos recuperados

### **3 - Objetivo**

Caracterizar a recuperação oocitária, produção de embriões e gestações de doadoras da raça Gir provenientes de rebanhos leiteiros situados no sul do Estado de Minas Gerais definindo grupos de animais em quartis de acordo com a recuperação oocitária.

## **4 - REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1- ASPIRAÇÃO FOLICULAR E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

A produção de embriões em laboratório (produção *in vitro* ou PIV) é uma técnica relativamente recente, mas que vem ganhando crescente importância como ferramenta para multiplicação de genótipos superiores. A técnica tornou-se mundialmente conhecida após o nascimento de Louise Brown, conhecida como o primeiro “bebê de proveta”, em 1978 (STEPHENS & EDWARDS, 1978). O primeiro nascimento de bezerro produzido *in vitro* ocorreu em 1981 (BRACKETT *et. al.*, 1982). O uso comercial da PIV, contudo, só foi possível com o desenvolvimento de procedimentos que possibilitassem a recuperação dos oócitos de doadoras vivas, como o caso da aspiração folicular orientada por ultrassom (Ovum Pick up, OPU). O primeiro relato do uso da técnica de punção folicular transvaginal na recuperação de oócitos em bovinos foi feito por Pieterse *et. al.* (1988), e as potenciais vantagens técnicas e econômicas levaram a uma rápida difusão da punção folicular entre os grupos de pesquisa em PIV (GALLI *et. al.*, 2001). A associação das técnicas de punção folicular e PIV foram consideradas como uma alternativa aos programas clássicos de superovulação e transferência de embriões (HASLER, 2003).

Na última década, a produção *in vitro* de embriões aumentou de forma expressiva no Brasil. Laboratórios comerciais começaram a ter sucesso real e se multiplicar, a quantidade de embriões produzidos *in vitro* saltou de números inexpressivos em 1998 para perto de 255.993 em 2009 (VIANA, 2010). Dentre os fatores que contribuíram para a expansão no uso da PIVE estão às particularidades da fisiologia reprodutiva das raças zebuínas, como o maior número de folículos em crescimento disponíveis nos ovários e, conseqüentemente, no maior número de complexos cumulus-oócito (COCs) recuperados na aspiração folicular (VIANA *et. al.*, 2004), quando comparado com os resultados obtidos com raças européias (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et. al.*, 2006).

Apesar de contornar algumas limitações da superovulação, uma vez que não depende da estimulação hormonal, a produção *in vitro* de embriões também é caracterizada por uma baixa eficiência relativa, considerando-se as taxas de blastocisto e de gestações obtidas (CAMARGO *et. al.*, 2006). A produção de embriões *in vitro* é um processo constituído essencialmente por três passos, a maturação do oócito, a fertilização e o subsequente cultivo do zigoto, todos limitantes para o resultado final (LONERGAN *et. al.*, 2003). Entretanto, assim como na superovulação, o componente doadora é uma das principais fontes de variação nos resultados. Conforme afirmam Sirard *et. al.* (2006), “*As condições do cultivo in vitro apenas possibilitam ao oócito a expressão de seu potencial de desenvolvimento, de forma que a produção in vitro de embriões bovinos é limitada, mesmo em condições ideais de cultivo, pelas características iniciais dos oócitos cultivados*”.

O oócito é o gameta feminino que contribui não somente com metade do seu material genético, mas também com praticamente todo o seu citoplasma para a formação do zigoto, suplementando as transcrições e sínteses proteicas necessárias para o desenvolvimento inicial embrionário. Este ambiente citoplasmático do oócito oferece condições necessárias para a ativação do genoma embrionário para que, sequencialmente, o embrião continue o seu desenvolvimento. Desta maneira, a qualidade oocitária é essencial para o desenvolvimento futuro do embrião, considerando o fato que uma apropriada ativação do genoma embrionário é a chave fundamental para o seu desenvolvimento subsequente (SCHULTZ, 2002).

#### **4.2 Dinâmica e divergência folicular**

O número de folículos em fase antral varia ao longo do ciclo estral, em função do padrão de crescimento folicular nos bovinos (ADAMS *et. al.*, 2008). A dinâmica folicular, nesta espécie, é caracterizada pelo surgimento de sucessivas ondas de crescimento folicular ao longo do ciclo estral, nas quais um conjunto de folículos com diâmetro entre dois e quatro milímetros é mobilizado, progredindo seu desenvolvimento (KNOPF *et. al.*, 1989; DRIANCOURT *et. al.*, 1991; TAYLOR & RAJAMAHENDRAN, 1991).

Grande atenção foi dada à caracterização do padrão de crescimento folicular em ondas, e ao processo de divergência e estabelecimento da dominância folicular, não apenas em bovinos, mas em diversas espécies domésticas de interesse zootécnico (GINTHER *et. al.*, 2003). A dinâmica folicular afeta diretamente os resultados da produção de embriões, seja *in vivo* ou *in vitro* (HUMBLLOT *et. al.*, 2005). O mecanismo de dominância envolve a produção de estradiol e inibina, que acarretam redução na concentração circulante de FSH e, como

consequência, atresia dos folículos subordinados (ADAMS *et. al.*, 2008). O efeito deletério da presença de folículos dominantes funcionais sobre a qualidade morfológica e capacidade de desenvolvimento *in vitro* de oócitos (LONERGAN *et. al.*, 2008) ou sobre o número e qualidade de embriões recuperados após a superovulação convencional (BO *et. al.*, 2008) é bem conhecido. O desenvolvimento de diferentes estratégias de sincronização do crescimento folicular permite hoje estabelecer protocolos que evitam estes efeitos e maximizam a produção de embriões, seja *in vitro* ou *in vivo* (BARUSELLI *et. al.*, 2006). Os protocolos de sincronização de doadoras, contudo, apenas garantem a presença de folículos com maior viabilidade, pelo controle do momento da emergência, não havendo evidências de que afetem o número de folículos na onda, ou seja, o potencial intrínseco das doadoras.

A caracterização do fenômeno da co-dominância trouxe nova atenção à questão da população folicular durante as ondas de crescimento. A codominância é responsável pela ocorrência de duplas ovulações e gestações gemelares, indesejáveis em bovinos leiteiros por sua associação com problemas de gestação e parto (LOPEZ-GATIUS *et. al.*, 2005), mas representa um modelo biológico interessante para o estudo de falhas no mecanismo de divergência (LOPEZ *et. al.*, 2005). A presença de folículos codominantes pode ser induzida experimentalmente pela elevação da concentração de FSH, contudo o papel deste mecanismo em situações reais é controverso (KULICK *et. al.*, 2001; BEG *et. al.*, 2003). Entretanto, em rebanhos selecionados para dupla ovulação, observou-se um aumento no número médio de folículos de todas as categorias (ECHTERNKAMP *et. al.* 2004), evidenciando a relação entre população folicular e padrão de crescimento folicular. Apenas recentemente, o fenômeno foi descrito em zebuínos, na raça Nelore (GIMENES *et. al.* 2008), não havendo relatos da sua incidência no Gir.

### **4.3 Perfil endócrino**

As fases iniciais do crescimento folicular não dependem da estimulação dos hormônios hipofisários, pois podem acontecer mesmo na sua completa ausência destes (GONG *et. al.*, 1995), e parecem ser controladas por fatores locais. A ação intraovariana de diversos fatores de crescimento foi melhor caracterizada no final da fase pré-antral e no início da fase antral (Crowe, 1999), período no qual o número de folículos destinados à atresia aumenta. Fatores de crescimento como o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I) aumentam a mitose das células da granulosa, induzem a formação de receptores para FSH,

potencializam a esteroidogênese induzida pelo FSH e diminuem a incidência de apoptose, sendo considerados como necessários para a sobrevivência dos folículos (CHUN & HSUEH, 1998). A administração de hormônio do crescimento em bovinos resulta no aumento do número de folículos em crescimento nos ovários (LUCY *et. al.*, 1994), e este efeito tem sido atribuído ao aumento na concentração intraovariana de IGF-I. Seu uso foi proposto como alternativa para aumentar o número de folículos disponíveis para a punção folicular (BURATINI JR., 2000, TRIPP *et. al.*, 2000). Os resultados do pré-tratamento com bST, contudo, são inconsistentes, sugerindo uma possível interação entre IGF e reserva ovariana.

A associação entre concentração plasmática de IGF e recrutamento folicular também pode ser observada em rebanhos selecionados para dupla ovulação, nos quais o aumento no número de folículos em crescimento foi associado a concentrações consistentemente mais elevadas de IGF plasmático (ECHTERNKAMP *et. al.*, 2004), e em rebanhos leiteiros de alta produção, que apresentam maior incidência de duplas ovulações (SARTORI *et. al.*, 2005) e nos quais a pressão de seleção para produção foi associada ao aumento no IGF plasmático. Coerentemente, raças zebuínas, que apresentam maiores médias de recuperação de oócitos por aspiração folicular quando comparadas a raças taurinas (VIANA *et. al.*, 2004; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et. al.*, 2006).

Uma vez atingida a fase antral, os folículos se tornam inicialmente sensíveis e, posteriormente, dependentes da estimulação gonadotrófica. A imunização contra o GnRH bloqueia a liberação de LH e FSH, e resulta em anestro, com o crescimento folicular sendo paralisado acima de quatro milímetros (CROWE, 1999). Este diâmetro está associado a uma série de mudanças metabólicas nas células da granulosa, como a expressão de RNAm para as enzimas P450 aromatase e P450 clivadora da cadeia lateral (P450SSC), que indicam a aquisição da capacidade esteroidogênica e consequente especialização destas células (BAO & GARVERICK, 1998). Folículos com diâmetro superior a quatro milímetros dependem da estimulação gonadotrófica para seu crescimento, sendo o FSH o principal fator de sobrevivência durante este período, atuando de maneira sinérgica com outros hormônios e fatores de crescimento (GONG *et. al.*, 1996). A concentração plasmática de FSH flutua ao longo do ciclo estral, de maneira coordenada com o padrão de crescimento folicular, e a associação temporal entre estes dois fatores foi demonstrada durante o ciclo estral (GINTHER *et. al.*, 1995; BERGFELT *et. al.*, 1997). Desta forma, qualquer avaliação de padrão de crescimento e viabilidade de folículos durante as ondas de crescimento deve considerar o efeito de variações na liberação de gonadotrofinas.

#### 4.4 Genética e produção de embriões

De maneira geral, as características reprodutivas na fêmea bovina apresentam baixa herdabilidade (0,04 a 0,16 para parâmetros como intervalo parto – 1º cio, cistos foliculares, abortos, retenção de placenta e intervalo de partos), o que limita a possibilidade da obtenção de ganhos por programas de seleção genética (PATERSON *et. al.*, 1992; SPLAN *et. al.*, 1998). Pelo menos em parte, esta baixa herdabilidade pode estar associada à dificuldade de avaliação ou mensuração direta dos parâmetros fisiológicos envolvidos, além do grande número de fatores de ambiente e de outras fontes de confundimento, como diferenças nas técnicas de diagnóstico ou estudo. A facilidade de acesso aos órgãos genitais e aos gametas resultou em avanços bem mais expressivos na identificação de componentes genéticos associados à reprodução nos machos (MIALON *et. al.*, 2001).

A produção de embriões *in vivo* é uma característica complexa, resultante da combinação da raça e *status* ovariano da doadora, do tipo, dose e protocolo hormonal utilizado, da qualidade do sêmen e inseminação, e da habilidade do técnico na coleta, o que pode explicar a inconsistência observada em estudos de herdabilidade para esta característica. Tonhati *et. al.* (1999) estimou uma herdabilidade de 0,03 para o número de embriões transferíveis em animais da raça holandesa, concluindo que esta não seria uma característica passível de seleção em programas de melhoramento. Um estudo posterior, contudo, estimou uma herdabilidade entre 0,20 e 0,65 para a mesma característica na raça nelore (PEIXOTO *et. al.*, 2004), com uma conclusão oposta a anterior.

A produção *in vitro* de embriões em escala comercial é um fenômeno recente no Brasil, e tem pouca expressão nos países desenvolvidos (VIANA & CAMARGO, 2007). Desta forma, inexistem trabalhos conclusivos sobre herdabilidade do número ou potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados por aspiração folicular. Entretanto, como a população de folículos disponíveis para aspiração é a mesma estimulada durante a superovulação, é provável que este parâmetro responda por parte da herdabilidade observada no número de ovulações.

Desta forma, tanto na produção de embriões *in vivo* quanto *in vitro*, a identificação dos possíveis componentes genéticos, a estimativa correta da herdabilidade e a seleção de doadoras pelo seu potencial de produção são limitados pela falta de parâmetros fisiológicos e endócrinos que permitam caracterizar corretamente os fenótipos em questão. A possibilidade da seleção (direta e indireta) para características associadas ao potencial como doadoras é

sugerida pelas características ovarianas e endócrinas de rebanhos selecionados pela dupla ovulação (ECHTERNKAMP *et. al.*, 2004), e também pela identificação de QTLs para gemelaridade nos cromossomos 8, 10 e 21 (COBANOGLU *et. al.*, 2005).

Estima-se que mais de 80% do rebanho nacional, hoje superior a 165 milhões de cabeças, seja formado por animais de raças zebuínas ou seus cruzamentos. Considerando-se que foram importados da Índia apenas 6.300 animais, é esperado encontrar-se um nível considerável de endogamia nos rebanhos (JOSAHKIAN, 2005). Na raça Gir, o coeficiente de endogamia da população foi considerado baixo (2,82%), mas contrastante com um percentual de animais endogâmicos elevado (REIS FILHO, 2006). A prática da manutenção de rebanhos fechados, antes do início dos testes de progênie, pode explicar esta diferença, indicando uma possível variação em características genéticas entre linhagens. Por outro lado, o uso intensivo de biotecnias reprodutivas pode intensificar o aumento da endogamia e perda de variabilidade genética na raça, incluindo para características relacionadas à fertilidade a campo, mas não necessariamente relacionadas à performance dos animais como doadores de sêmen ou embriões.

#### **4.5 Reserva ovariana**

Em todas as fêmeas mamíferas, a reserva de oócitos é estabelecida durante a vida fetal e pós-natal inicial, sendo gradualmente mobilizada após o nascimento, durante toda a vida reprodutiva (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999). O chamado “pool” de reserva é constituído por folículos primordiais, que podem permanecer por anos em um estado quiescente, ou iniciar um processo irreversível de desenvolvimento e que culmina com a ovulação ou, na maior parte das vezes, com a atresia (FINDLAY, 1994; ERICKSON & SHIMASAKI, 2001). Apesar de constituírem a maior parte dos folículos presentes nos ovários, os estádios iniciais de desenvolvimento são os menos conhecidos, e os fatores responsáveis pelo controle do início do crescimento folicular não são totalmente compreendidos (PICTON, 2001). Entretanto, parece haver uma relação inversa entre tamanho da reserva de folículos primordiais e a proporção de folículos que iniciam seu desenvolvimento (GOUGEON & CHAINEY, 1987; HIRSHFIELD, 1994). Esta relação faz com que o número de folículos em desenvolvimento se mantenha em um determinado patamar ao longo da vida reprodutiva, até que a reserva de folículos primordiais seja esgotada. Desta forma, o número de folículos em fase antral observado durante o ciclo estral pode refletir, pelo menos em parte, a reserva de folículos primordiais presente (GÜLEKLI *et. al.*, 1999).

Não existe uma metodologia que permita a determinação da reserva ovariana na doadora viva, entretanto há elevada repetibilidade no número de folículos recrutados por onda; (Boni *et. al.*, 1997) sugere que a relação entre reserva ovariana e recrutamento seja verdadeira também em bovinos. Avaliações do padrão de crescimento folicular, desde que realizados no mesmo momento do ciclo e em animais apresentando *status* fisiológico semelhante poderiam, desta forma, dar um indicativo da reserva de um determinado animal e, talvez, do seu potencial futuro como doadora, particularmente considerando a extrema variação observada no número de folículos primordiais presentes mesmo em animais pré-puberes (ERICKSON *et. al.*, 1976).

Testes de reserva ovariana são rotineiramente empregados previamente a ciclos de reprodução assistida na medicina humana (BUKULMEZ & ARICI, 2004). Entre estes testes, estão a avaliação das concentrações basais de estradiol, FSH, inibina B, hormônio antimülleriano, além do teste do citrato de clomifeno. As avaliações endócrinas, contudo, são uma medida indireta do crescimento folicular, e os resultados destes testes nem sempre são consistentes, sendo seu uso motivo de controvérsia (BROEKMANS *et. al.*, 2006). A contagem direta dos folículos antrais por ultrassonografia mostrou-se mais efetiva na predição dos resultados da PIVE que os testes endócrinos (Avril, 2006). Contudo, a associação de avaliações diretas da população folicular com parâmetros físicos (tamanho de ovário), hemodinâmicos e endócrinos pode ser a melhor alternativa para a avaliação da reserva ovariana.

## **5 – Material e Métodos**

O presente experimento foi realizado entre os meses de fevereiro de 2008 e fevereiro de 2011, e utilizou vacas e novilhas da raça Gir, puro de origem (PO), pertencentes ao rebanho da empresa Biotran LTDA, e de rebanhos da região sul do Estado de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em um sistema de criação a pasto, com suplementação que atende a demanda nutricional. Previamente às aspirações, os animais foram submetidos a um protocolo hormonal objetivando sincronizar o crescimento folicular e permitir a realização do procedimento no início da onda folicular. Foram realizadas 626 sessões de aspiração em 251 animais diferentes, sendo que alguns animais foram submetidos a mais de uma sessão de aspiração, conforme indicado na Tabela 1. A produção *in vitro* de embriões foi realizada no laboratório comercial da empresa Biotran, sendo todos os oócitos fecundados utilizando-se sêmen sexado para fêmea da raça Gir.

Tabela 1: Numero de animais e sessões de aspiração folicular que foram submetidos.

	<i>Numero de animais</i>	<i>Sessões de aspiração folicular</i>
	251	<i>1</i>
	121	<i>2</i>
	73	<i>3</i>
	55	<i>4</i>
	36	<i>5</i>
	30	<i>6</i>
	19	<i>7</i>
	14	<i>8</i>
	8	<i>9</i>
	6	<i>10</i>
	5	<i>11</i>
	4	<i>12</i>
	2	<i>13</i>
	2	<i>14</i>
Total	626	-----

### **5.1 - Sincronização**

A sincronização dos ciclos estrais foi realizada por meio de protocolos convencionais, pela associação de implantes auriculares de norgestomet (crestar<sup>®</sup>, Intervet), 2ml de benzoato de estradiol (Ric-be<sup>®</sup> Intervet) utilizando-se agulhas 40X12 e seringa de 3ml e 0,530 mg de cloprostenol sódico (ciosin<sup>®</sup> Intervet) utilizando-se agulhas 30X12 e seringa de 3ml. O dia do início do protocolo foi considerado como dia 0 do ciclo, os animais foram submetidos à aspiração folicular 5 dias após o início do mesmo.

### **5.2 - Aspiração folicular orientada por ultrassonografia**

A aspiração folicular para obtenção dos COCs foi realizada utilizando-se os procedimentos convencionais, conforme previamente descrito (LEROY *et. al.*, 2005). Foi utilizado um aparelho portátil de ultrassom (Aquila Vet<sup>®</sup>, Esaote) equipado com um transdutor micro convexo intravaginal de 7,5 MHz, acoplado a um dispositivo-guia para agulha de punção. As punções para obtenção de COCs foram realizadas com agulhas

descartáveis de 0,6 e 0,8 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, e 50 mm de comprimento (WTA<sup>®</sup>). A agulha estava conectada por meio de circuito de teflon (WTA<sup>®</sup>) a um recipiente (tubo do tipo falcon de 50 ml) contendo 5 ml DPBS (Nutricell<sup>®</sup>), acrescido de 25 µg/mL de heparina (foto 1). O sistema de sucção foi mantido por uma bomba de vácuo (WTA<sup>®</sup>) calibrada para sugar 12 mL de meio por minuto.



Foto 1 – Equipamentos utilizados para aspiração folicular guiada por ultrassom



Foto 2 – Procedimento de aspiração

Previamente a cada sessão de coleta foi feita anestesia epidural pela aplicação de 3 mL de lidocaina a 2% (Lidovet<sup>®</sup>) entre a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> vértebras coccígeas utilizando-se agulha 40X12 e seringa de 5ml. A vulva e a região perineal foram cuidadosamente limpas e desinfetadas. Após o posicionamento do transdutor na extremidade cranial da vagina, os ovários foram movimentados manualmente por via retal, de forma a permitir maior proximidade entre os folículos e o sistema de punção. O aspirado folicular foi coletado em tubos do tipo falcon de 50 mL, mantidos à temperatura de 37°C (foto 2). Após a coleta o material aspirado foi encaminhado ao laboratório para identificação e classificação dos oócitos recuperados.

### 5.3 - Preparo do material aspirado

Imediatamente após cada sessão de aspiração, o material foi encaminhado a um laboratório onde o conteúdo aspirado foi lavado com uma solução DPBS aquecida a 37°C em filtro de coleta de embriões WTA<sup>®</sup>, para separação do sangue eventualmente aspirado. Posteriormente o conteúdo foi transferido para placas de petri descartáveis de 90 mm de diâmetro com o fundo quadriculado, nas quais as estruturas recuperadas foram identificadas com auxílio de estério-microscópio. Os COCs foram separados e acondicionados em placas de petri descartáveis de 35 mm contendo uma gota com 70 µl de meio de lavagem (TCM-heps acrescido de bicarbonato de sódio), onde foram contabilizados e classificados para posterior

encaminhamento ao laboratório de produção *in vitro* de embriões que estava a um alcance de no máximo 8 horas (foto 3).



Foto 3 – Equipamento do Laboratório de Campo

#### **5.4 Avaliação morfológica dos COCs recuperados**

Como critério de seleção morfológica dos oócitos foi utilizada a classificação descrita por Viana *et. al.* (2004). Resumidamente, os complexos cumulus-oócito (COCs) foram classificados em função do número de camadas e o grau de compactação do cumulus, pela coloração e uniformidade do citoplasma, como Grau I (excelentes), II (bons), III (parcialmente desnudos), IV (desnudos) ou V (atrésicos). Cada doadora submetida à sessão de aspiração teve suas informações de recuperação de oócito dividida por categorias mensuradas e anotadas em planilhas de campo próprias, para posterior divisão dos animais em quartis de acordo com a recuperação de COCs.

O critério utilizado para avaliar o potencial individual da doadora foi o número total de oócitos recuperados. Nos casos em que o mesmo animal foi submetido a mais de uma coleta somente a coleta com maior recuperação de oócitos totais foi considerada. Seguindo este critério os animais foram separados em 4 quartis de acordo com o total de oócitos recuperados e as médias de recuperação de oócitos viáveis, produção de embriões e percentagem de prenhes foram comparadas entre os quartis.

## 5.5 Avaliação do potencial de desenvolvimento *in vitro*

O potencial de desenvolvimento dos COCs foi estimado pelo resultado na produção *in vitro* de embriões provenientes dos oócitos recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassom. Os cultivos foram feitos separadamente, por doadora. A maturação *in vitro* foi realizada em meio TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 20µg/mL de FSH, em poços com 400 µL, em estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas. Após a MIV, os COCs foram fecundados com sêmen de touros Gir previamente testados na PIV. Para preparação dos espermatozoides foi utilizado o método da centrifugação em gradiente de percoll. Em seguida os espermatozoides foram distribuídos em gotas de fecundação (100 µL) sob óleo mineral na concentração de 1x10<sup>6</sup> sptz/mL, permanecendo em cultivo com os COCs por 18 a 22 h nas mesmas condições de maturação. Os possíveis zigotos foram transferidos para o meio CR2aa acrescido de 10% de soro fetal bovino em gotas de 50µL sob óleo mineral e cocultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação. Após 48 horas do início do cultivo, 50% do meio foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. No sétimo dia foi avaliada a taxa de produção de embriões.

Os embriões classificados como grau I e II, seguindo a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Manual da IETS, 1998), foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas e avaliadas.

Para cada doadora submetida ao processo de aspiração folicular foram sincronizadas em média 10 receptoras. Dois dias antes da aspiração folicular foram administrados 0,530 mg de cloprostenol sódico pela via intramuscular. Foram considerados sincronizados com a idade do embrião e aptos a serem utilizados os animais em estro no dia da FIV, tolerando-se uma variação de ± 1 dia. Antes da transferência todas receptoras sincronizadas foram examinadas via palpação transretal e o lado da ovulação foi identificado. Animais cujo tônus uterino foi considerado firme e/ou o corpo lúteo foi pequeno foram descartados. A vulva e a região perineal foram cuidadosamente limpas e desinfetadas, e uma anestesia epidural pela aplicação de 5 mL de lidocaína a 2% foi feita entre a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> vértebras coccígeas. O embrião foi depositado cranialmente ao corno ipsilateral ao corpo lúteo utilizando-se inovulador tipo Hannover. Todas as transferências foram realizadas por um mesmo técnico.

## 5.6 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias pós-fecundação com auxílio de um aparelho portátil de ultrassom equipado com um transdutor linear retal de 8,0 MHz (Aquila Vet, Esaote). Cada animal foi devidamente contido em um brete apropriado, as fezes



Foto 4 – útero Gestante



Foto 4 – útero não Gestante

presentes no reto foram retiradas e o transdutor do aparelho de ultrassom inserido e posicionado manualmente pelo operador. O diagnóstico positivo se deu pela presença de líquido e vesícula gestacional em quantidade compatível com a idade da gestação (foto 4). O resultado negativo se deu quando o útero se apresentou em toda sua extensão colabado, ou seja, com ausência de líquido e, portanto não gestante (foto 5).

## 5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de aspirações de folículos ovarianos de vacas da raça Gir, com pelo menos um oócito recuperado (626), foram submetidos à análise estatística descritiva. As médias seguidas de desvio padrão, bem como as frequências de distribuição do total de oócitos recuperados, viáveis e daqueles classificados quanto ao grau de qualidade, estão apresentadas na forma de tabelas e figuras. Da mesma forma, os embriões produzidos foram distribuídos de acordo com o estágio de desenvolvimento e o grau de qualidade, e os percentuais de gestação de cada classe de embrião foram comparados pelo teste exato de Fisher (*versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*).

Posteriormente, as vacas foram ordenadas em um dos quatro quartis de acordo com a distribuição de frequência do total de oócitos recuperados em cada sessão de aspiração. O critério utilizado para a separação das vacas em quartis foi a sessão de aspiração com recuperação máxima de oócitos totais, considerando uma sessão por vaca. Desta forma, 251 sessões de aspiração folicular foram incluídas nesta análise, e a distribuição de frequências

utilizou o processamento PROC FREQ (*versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*). O primeiro quartil incluiu os 25% dos animais com maior número de oócitos recuperados em uma única coleta (1º quartil). Na sequência, os quartis intermediários (2 e 3) compreenderam os 50% das vacas com recuperação oocitária intermediária, e o 4º quartil englobou os 25% com resultados inferiores. Os dados das coletas de oócitos foram previamente avaliados quanto à distribuição de normalidade (*teste de Shapiro Wilk, PROC UNIVARIATE, versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*) e transformados em log (x), raiz quadrada (X) e RANK. Quando necessário, transformações em log (X) foi realizada para os dados de oócitos não viáveis, raiz quadrada (X) foi feita para os oócitos viáveis, e organização em RANK para os dados de embriões. Diferenças significativas foram posteriormente detectadas com auxílio do procedimento PROC GLM (*versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*). As médias de oócitos recuperados (viáveis e não viáveis) de embriões, bem como a taxa de gestação foram comparadas entre os quartis separados de acordo com a recuperação de oócitos totais de cada animal. Da mesma forma, as taxas (%) de conversão dos oócitos (total e viável) para embriões e para gestação, e de embriões para gestação, foram comparadas entre os quartis. Diferenças entre as médias dos quartis foram acessadas pelo teste de DUNCAN e os dados de frequência foram avaliados pelo teste exato de Fisher (*versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*).

O efeito do número de aspirações sobre a recuperação total de oócitos, número de viáveis e produção de embriões foi avaliado dentro do primeiro quartil. Para tanto, somente animais que tiveram no mínimo quatro sessões (n=22) de aspiração e com intervalos entre aspirações variando de 15 a 60 dias foram incluídos nesta análise. Modelos linear e quadrático, considerando a sequência de coletas, o efeito de cada coleta em relação a imediatamente anterior e o efeito de cada coleta em relação a primeira, foram construídos utilizando o procedimento PROC REG e testados pelo PROC MIXED (*versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*).

Para todas as análises as probabilidades menores que 5% foram consideradas estatisticamente significantes, ao passo que probabilidades menores que 10% foram consideradas aproximações.

## 6 – Resultados

### 6.1 Recuperação de oócitos e qualidade.

Considerando as 626 sessões, o total de oócitos recuperados foi de 11.142, com uma média de  $17,8 \pm 12,0$  por sessão de aspiração (Tabela 2). Deste total 7.980 (71,6%) foram classificadas como oócitos viáveis, o que significou uma média de  $12,7 \pm 12,0$  por aspiração. O restante das estruturas (3.162, 28,4%) foram classificados como não viáveis para a maturação *in vitro*.

Tabela 2 - Número total, média e IC do total de oócitos recuperados e classificados como viáveis e não viáveis em 626 sessões de aspiração folicular na raça Gir.

Oócitos recuperados	Total	Media $\pm$ DP	Intervalo de confiança (95%)*
<b>Total</b>	11.142	$17,8 \pm 12,0$	16,9 – 18,7
<b>Viáveis</b>	7.980	$12,7 \pm 9,6$	12,0 – 13,5
<b>Não viáveis</b>	3.162	$5,0 \pm 5,6$	4,6 – 5,5

\* Intervalo de confiança da média. 95% de probabilidade da média se encontrar dentro do intervalo.

O total de oócitos recuperados de uma doadora da raça Gir foi variável, registrando valores tão baixos quanto 1 e tão altos como 76 estruturas por sessão (Figura 2). No entanto, o resultado mais frequente foi de 10 oócitos, observado em 35 sessões (5,6%). Para os oócitos classificados como viáveis o quadro foi semelhante, a variação ficou entre 0 e 57 oócitos viáveis por sessão. O resultado mais frequente foi de 10 oócitos, e se repetiu em 41 (6,5%) sessões de aspiração. Apesar da alta variação (valores entre 0 a 48), a recuperação de oócitos classificados como não viáveis foi um pouco mais consistente. Cerca de 90% (559/626) das sessões de aspiração recuperaram entre 0 e 10 oócitos com esta classificação e o resultado mais frequente foi de 2 oócitos não viáveis (13.1%, 82/626).

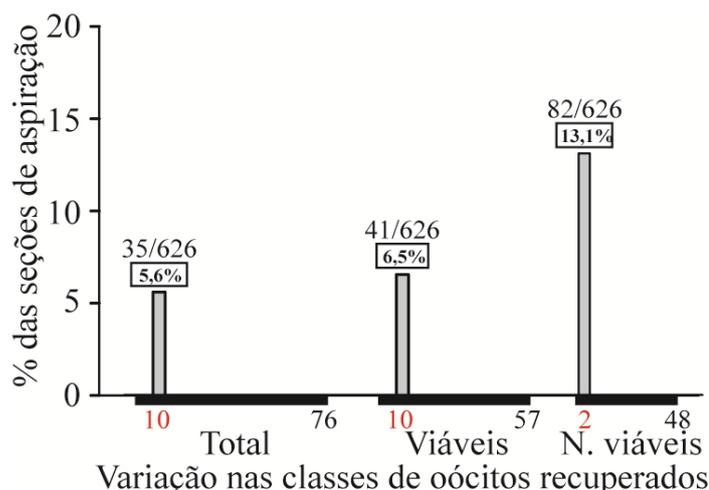


Figura 1 – Resultados mais frequentes na recuperação do total de oócitos e diferentes classes (viáveis e não viáveis) de vacas Gir. As barras em destaque no eixo X evidenciam a variação do número de oócitos recuperados em cada classe.

Os oócitos classificados como viáveis foram distribuídos em três categorias de acordo com sua qualidade (Figura 2). Na primeira categoria, designada grau de qualidade I, foram enquadrados 439 oócitos, representando 5,5% dos viáveis e perfazendo uma média aproximada de 0,7 por sessão de aspiração. Para aqueles classificados com grau de qualidade II a recuperação foi de 1.958 (24,5%), sendo recuperados em média 3,1 oócitos GII por aspiração. Completando os viáveis foram recuperados 5.583 oócitos grau III (70%), média de aproximadamente 8,9 por sessão (Tabela 2).

Aqueles oócitos classificados como não viáveis (3.162) foram atrésicos e desnudos e 744 (23,5%) foram classificados como atrésicos, média aproximada de 1,2 por aspiração (Figura 3). O número de oócitos atrésicos recuperados variou de 0 a 20 nas coletas. Em 50,6% (317/626) das coletas nenhum oócito atrésico foi recuperado, e em 23,3% (146/626) recuperou-se apenas um oócito desta categoria. Os oócitos não viáveis, por não apresentarem camadas de células do cúmulo (desnudos), responderam por 2.418 (76,5%), o que significou aproximadamente 3,9 oócitos desta categoria por vaca aspirada (Tabela 3). A recuperação de oócitos desnudos apresentou uma variação maior, de 0 a 41 oócitos. Os resultados mais frequentes foram 0 (17,7% das coletas, 111/626) e 1 (15,6%, 98/626) oócito desnudo por sessão.

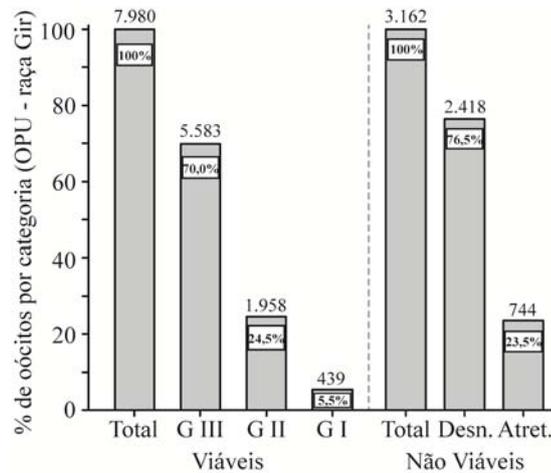


Figura 2 – Percentual de oócitos em cada uma das categorias de viáveis e não viáveis.

Tabela 3 – Divisão das categorias de oócitos viáveis e desnudos respectivamente.

Oócitos recuperados	Total	Média ± DP	Intervalo de confiança (95%)*
<b>Viáveis</b>	7980		
<b>Grau I</b>	439	0,7 ± 1,4	0,6 – 0,8
<b>Grau II</b>	1958	3,1 ± 3,8	2,8 – 3,4
<b>Grau III</b>	5.583	8,9 ± 7,6	8,3 – 9,5
<b>Não viáveis</b>	3.162	-	-
<b>Atrésicos</b>	744	1,2 ± 2,1	1,0 - 1,4
<b>Desnudos</b>	2.418	3,9 ± 4,9	3,5 - 4,2

\* Intervalo de confiança da média. 95% de probabilidade da média se encontrar dentro do intervalo.

## 6.2 Produção de embriões e taxa de gestação pós-transferência

Do total de 626 sessões de aspiração analisadas para a recuperação oocitária, 610 foram utilizadas para avaliação da produção de embriões. As 16 sessões restantes foram desconsideradas por inconsistência de informações ou problemas técnicos não relacionados às doadoras, como contaminação no cultivo. Nas sessões analisadas, foram produzidos 2.508 embriões (taxa de 23,3% em relação ao total de oócitos e 33,3% em relação aos viáveis), perfazendo uma média de  $4,1 \pm 4,0$  embriões por sessão de aspiração (Tabela 4). A variação foi de 0 a 27 embriões e 73% (n=445) das baterias de cultivo produziram até 5 embriões. A produção mais frequente foi de 1 embrião (14,3%, 87/610) e 15,6% (95/610) das baterias não produziram embriões. Quando foram desconsideradas as sessões que não produziram, a produção média de embriões subiu para  $4,9 \pm 3,9$ , e 79% das coletas produziram até 7 embriões.

Tabela 4 - Produção média de embriões de doadoras da raça Gir por sessão de aspiração folicular

<b>Produção de embriões</b>	<b>Total</b>	<b>Media ± DP</b>	<b>IC (95%)*</b>
<b>Total<sup>1</sup></b>	2.508	4,1 ± 4,0	3,8 – 4,4
<b>Baterias que produziram<sup>2</sup></b>	2.508	4,9 ± 3,9	4,5 – 5,2

\* Intervalo de confiança da média. 95% de probabilidade da média se encontrar dentro do intervalo.

<sup>1</sup> Total em 610 coletas com informação de produção de embriões.

<sup>2</sup> Total de 515 coletas que produziram embrião.

Os embriões produzidos no D7 foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade. Algumas categorias foram pouco representativas, e apenas produziram 10 mórulas (0,4% do total de embriões), 23 Bi-II (0,9%), 10 BL-II (0,40%) e apenas 2 BX-II (0,1%) foram registrados. As categorias de embriões mais representativas foram Bi-I, BL-I, BX-I e BE-I (Tabela 5). Embriões no estágio de Bi-I representaram 13,4% do total (337/2463). Em aproximadamente 31% (191/610) das sessões de aspiração foram produzidos embriões neste estágio de desenvolvimento, e a produção mais frequente foi de 1 Bi-I (18,2% das sessões, 111/610). A produção média de Bi-I por aspiração ficou em  $0,6 \pm 1,0$  embrião. O estágio seguinte, BL-I, representou 36,8% dos embriões produzidos (923/2.508). A frequência deste estágio de desenvolvimento foi bem maior, e 351 sessões (77,7%) produziram pelo menos 1 BL-I, com média de  $1,5 \pm 2,0$  estruturas por cultivo. O estágio embrionário mais representativo foi o de BX-I, com 1.123 estruturas produzidas (44,78% do total). A média para esta categoria ficou em  $1,8 \pm 2,5$  embriões por cultivo, e 355 sessões de cultivo produziram embriões nesse estágio. O último estágio de desenvolvimento observado foi BE-I. Foram produzidas 80 (3,2%) estruturas nesse estágio em 62 baterias de cultivo, e a média deste estágio foi inexpressiva (Tabela 5)

Tabela 5 – Produção de embriões nos diferentes estágio de desenvolvimento e percentual da produção total

<b>Estádio</b>	<b>Número</b>	<b>Media ± DP</b>	<b>IC (95%)*</b>	<b>% da produção</b>
<b>Bi-I</b>	337	$0,6 \pm 1,0$	0,5 – 0,6	13,4
<b>BL-I</b>	923	$1,5 \pm 2,0$	1,4 – 1,7	36,8
<b>BX-I</b>	1123	$1,8 \pm 2,5$	1,6 – 2,0	44,8
<b>BE-I</b>	80	$0,1 \pm 0,4$	0,1 – 0,2	3,2
<b>Total</b>	2.463 <sup>1</sup>	-	-	100,0

\* Intervalo de confiança da média. 95% de probabilidade da média se encontrar dentro do intervalo.

<sup>1</sup> Descontas as categorias de embriões com pouca representatividade (mórulas, Bi-II, BL-II e BX-II).

As informações referentes à transferência dos embriões e diagnóstico de gestação foram recuperadas de 468 sessões de aspiração folicular. Desta forma, foram computados 2.213 embriões transferidos, e que resultaram em 1.053 gestações (47,6%). Considerando-se os principais estádios de desenvolvimentos dos embriões produzidos, as taxas de gestações foram de 41,2% para Bi I (121/294), 44,8% (369/823) para BL I, 52,0% (514/989) para BX I e 54,9% (39/71) para Be I. Os embriões em estágio mais avançados (BX-I e BE-I) produziram taxas de gestação maiores ( $P < 0,01$ ) do que embriões em estádios mais precoce de desenvolvimento. As demais categorias de embriões transferidos produziram juntas uma taxa de gestação de 27,8% (10/36), inferior à média das mencionadas anteriormente ( $P < 0,0004$ ).

Tabela 6 - Número de embriões e gestações por estágio de desenvolvimento embrionário.

<b>Estádio<sup>1</sup></b>	<b>Embriões<sup>2</sup></b>	<b>Gestações<sup>2</sup></b>	<b>% Gestação</b>
<b>Bi-I</b>	294	121	41,2b
<b>BL-I</b>	823	369	44,8b
<b>BX-I</b>	989	514	52,0 <sup>a</sup>
<b>BE-I</b>	71	39	54,9 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	2.177	1.043	48,4

<sup>1</sup> Categorias de embriões com maior representatividade.

<sup>2</sup> Dados referentes a 468 sessões de aspiração que produziram embriões e possuíam informações de taxa de gestação até o momento da análise.

<sup>a,b</sup>  $P < 0,01$  ( $X^2$ )

### **6.3 Variação individual e distribuição das doadoras em quartis de acordo com a recuperação total de oócitos**

A distribuição dos animais nos quartis seguiu o critério dos melhores resultados de recuperação de oócitos totais contidos no histórico de cada indivíduo. O objetivo foi separar as doadoras em classes, o que facilitaria as comparações entre os animais, haja vista a grande variação individual. Para isto foram analisados dados de 251 animais, que produziram um total de 4.249 oócitos, sendo que destes, 1.293 foram classificados como viáveis, produzindo 1001 embriões e 453 gestações.

Ficaram caracterizados como primeiro quartil animais com recuperação total superior a 30. O segundo e terceiro quartil ficaram caracterizados com recuperação oocitária de 21 à 30 e 12 à 20 oócitos, respectivamente, e o quarto quartil foi caracterizado com produção abaixo de 12 oócitos totais.

Os animais do primeiro, segundo, terceiro e quarto quartis obtiveram médias de recuperação oocitária total de  $41,6 \pm 10,6$ ;  $25,2 \pm 3,0$ ;  $15,0 \pm 2,6$  e  $6,7 \pm 3,1$  oócitos, respectivamente. As médias de oócitos viáveis foram de  $29,1 \pm 11,2$ ;  $18,1 \pm 5,3$ ;  $11,1 \pm 3,7$  e  $4,5 \pm 2,7$  oócitos, respectivamente, para os quartis I, II, III e IV (figura 4 e Tabela 7). O critério de separação dos animais pela recuperação de oócitos totais criou uma expectativa quanto ao potencial de produção de embriões. No entanto, parte destes animais não correspondeu ao esperado nas demais etapas do processo de produção de embriões. Para este trabalho, usou-se um desvio padrão acima e/ou abaixo da média para detectar os animais que destoaram dentro de cada uma das etapas da PIVE. No primeiro quartil 14,3% (8/56) das vacas superaram em um desvio padrão a média de estruturas viáveis recuperadas, fornecendo mais de 40 estruturas após a aspiração folicular. No entanto, cerca de 16,1% (9/56) das vacas deste grupo forneceram menos de 18 oócitos na sessão de aspiração avaliada, o que colocaria estes animais dentro da média do segundo quartil. Dentro do quarto quartil, 13 vacas (18,8%) ficaram um desvio padrão abaixo da média de oócitos viáveis recuperados, fornecendo menos que 2 oócitos viáveis no procedimento de aspiração avaliado.

As médias de produção de embriões para o I, II, III e IV quartis foram de  $8,6 \pm 5,7$ ;  $5,2 \pm 3,6$ ;  $3,8 \pm 2,8$  e  $1,8 \pm 1,8$ , respectivamente. Quando segregados os indivíduos um desvio padrão acima da média, tem-se para o primeiro quartil 9 animais, o que representa 16,7% do grupo com uma produção acima de 14 embriões e um desvio abaixo também 16,7% dos animais com produção menor do que 3 embriões. Para o quarto quartil, utilizando o mesmo critério, 9 animais estão um desvio acima da média, o que representa 13,4% do grupo com uma produção maior do que 3 embriões, e 18 animais (26,9%) estão um desvio abaixo sem produção de embriões.

As médias de gestações quando separadas por quartil foram de 46,0, 44,9, 43,9 e 45,6% para I, II, III e IV quartil, respectivamente.

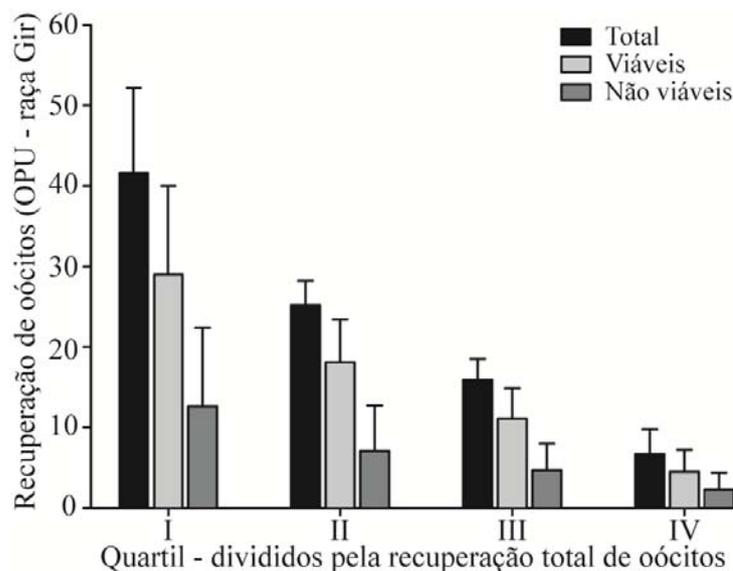


Figura 3. Distribuição do total de oócitos e aqueles classificados como viáveis e não viáveis em cada quartil.

O primeiro quartil produziu um total de 1.890 oócitos, sendo que, destes, 1.293 foram considerados como viáveis. A taxa de conversão de oócitos viáveis para embrião foi de 31,9 %, e resultou na produção de 413 embriões em diferentes estádios, e 190 gestações. Dos animais pertencentes ao 2º e 3º quartis, foram recuperados 1.260 e 772 oócitos, sendo 888 e 773 oócitos viáveis, produzidos 276 e 198 embriões e resultaram em 124 e 87 gestações, respectivamente. Nos animais pertencentes ao 4º quartil, foram recuperados 324 oócitos no total, dos quais 219 considerados viáveis, e foram produzidos 114 embriões e 52 gestações.

Tabela 7. Recuperação de oócitos totais e classificados como viáveis, bem como dos embriões produzidos e o percentual de gestação entre os quartis

Quartil	N	Total <sup>1</sup>	Viáveis <sup>1</sup>	Embriões <sup>2</sup>	Gestações <sup>3</sup>
I	56	41,6 ± 10,6	29,1 ± 11,0 <sup>a</sup>	8,6 ± 5,7 <sup>a</sup>	46,0
II	63	25,2 ± 3,0	18,1 ± 5,3 <sup>b</sup>	5,2 ± 3,6 <sup>b</sup>	44,9
III	63	15,9 ± 2,6	11,1 ± 3,7 <sup>c</sup>	3,8 ± 2,8 <sup>c</sup>	43,9
IV	69	6,7 ± 3,1	4,5 ± 2,7 <sup>d</sup>	1,8 ± 1,8 <sup>d</sup>	45,6
<b>Valor P</b>		- - -	<i>P</i> <0,0001	<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,95

<sup>1</sup> Oócitos. Dados referentes a 251 aspirações.

<sup>2</sup> Produção de embriões. Dados referentes a 243 sessões de aspiração com informação de embriões.

<sup>3</sup> Percentual de Gestação. Dados referentes a 186 sessões de aspiração folicular que produziram embriões e possuem informações sobre gestação.

Os oócitos foram avaliados quanto à capacidade de produzirem embriões e gestação. Os fatores de conversão (percentual do total oócitos e dos viáveis) de oócitos totais e viáveis para embrião e gestação foram ilustrados na Figura 4. Comparando-se somente os 3 primeiros quartis, somente a conversão de oócitos totais para embrião foi maior (*P*<0,05) no terceiro

quartil do que nos demais. Esta diferença se deve somente ao percentual de oócitos classificados como viáveis, que foi maior ( $P < 0,05$ ) no III quartil quando comparado ao I (74,2 vs 68,4%, respectivamente). Desta forma, somente as comparações entre o primeiro e o quarto quartil foram descritas para as conversões. Entre estes dois grupos de animais não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no percentual de oócitos totais classificados como viáveis (68,4 vs 67,6%, para o 1º e 4º quartis, respectivamente). Todos os percentuais de conversão foram superiores ( $P < 0,05$ ) nos oócitos recuperados dos animais pertencentes ao 4º quartil, quando comparados aos recuperados daqueles do 1º quartil (Figura 4). Destaca-se a maior ( $P < 0,05$ ) conversão de oócitos viáveis em embriões observada para o 4º quartil quando comparado ao I (tabela 8).

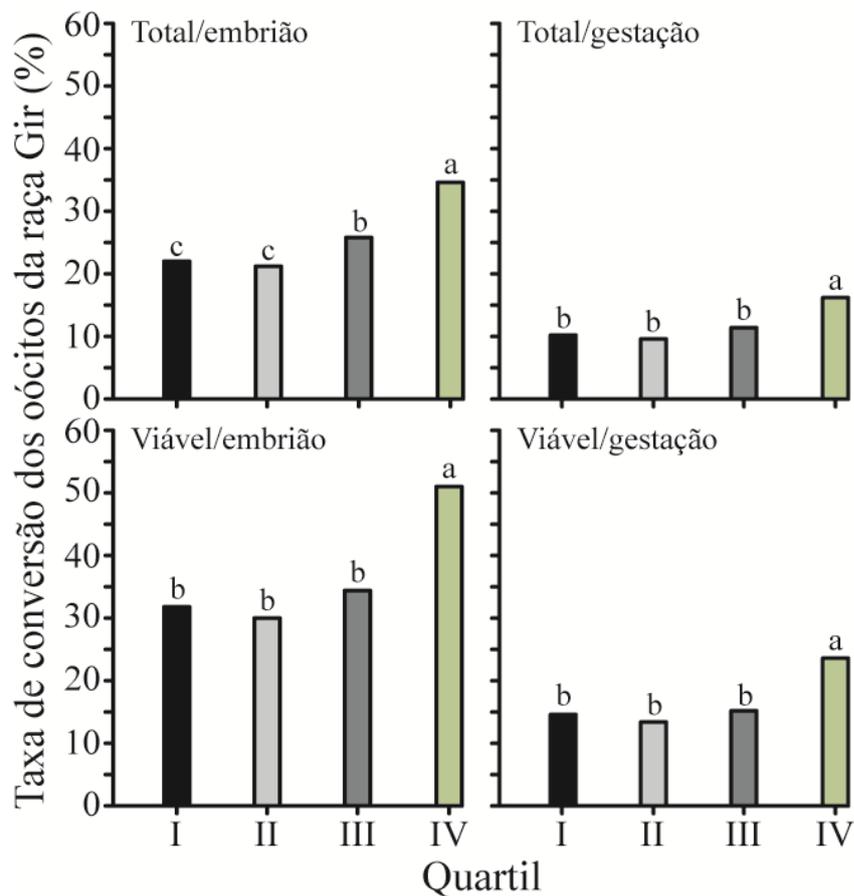


Figura 4. Taxa de conversão dos oócitos recuperados de doadoras da raça Gir. Os valores são expressos em percentual oócitos totais que produziram embriões, e gestações e o percentual dos oócitos viáveis que produziram embriões e gestações

Tabela 8 - Percentuais de conversão para as variáveis analisadas dentro de cada quartil de recuperação oocitária.

Quartil	Conversões <sup>1</sup>					
	Total/ Viáveis	Total/ Embrião	Total/ Gestação	Viáveis/ Embrião	Viáveis/ Gestação	Embrião/ Gestação
Primeiro	68,4 <sup>b</sup>	21,9 <sup>C</sup>	10,1 <sup>B</sup>	31,9 <sup>B</sup>	14,7 <sup>B</sup>	46,0
Segundo	70,3 <sup>ab</sup>	21,1 <sup>C</sup>	9,4 <sup>B</sup>	30,1 <sup>B</sup>	13,4 <sup>B</sup>	44,6
Terceiro	74,2 <sup>a</sup>	25,6 <sup>B</sup>	11,3 <sup>B</sup>	34,6 <sup>B</sup>	15,2 <sup>B</sup>	43,9
Quarto	67,6 <sup>b</sup>	34,6 <sup>A</sup>	16,0 <sup>A</sup>	51,1 <sup>A</sup>	23,7 <sup>A</sup>	46,4
Total	70,0	23,3	10,5	33,3	15,1	45,3
P value	P<0,02	P<0,0001	P<0,005	P<0,0001	P<0,002	p<0,95

<sup>1</sup> – valores percentuais

Foram testados os modelos linear e quadrático de regressão para explicar a variação na recuperação de oócitos total e viáveis nos animais do primeiro quartil submetidos a 4 sessões de aspiração (intervalos de 15 a 60 dias entre cada uma). Dentro de cada modelo, primeiramente, avaliou-se o efeito da sequência de coletas (n=4). Em seguida, o efeito de cada coleta foi avaliado pelo teste da diferença entre uma coleta e a anterior (exemplo: 2-1; 3-2 e 4-3). Por último, testou-se o efeito das demais coletas comparado com a primeira (exemplo: 2-1; 3-1 e 4-1). Para a recuperação de oócitos totais e viáveis nenhum dos modelos testados para os efeitos acima citados foi significativo (P<0,9 e 0,6, respectivamente). Desta maneira, a variável recuperação de oócitos totais e classificados como viáveis se comportou de forma constante ao longo de 4 coletas com intervalos de 15 a 60 dias (Figura 5). Valores médios de cada categoria de oócito recuperado em cada uma das sessões são apresentados na Tabela 9.

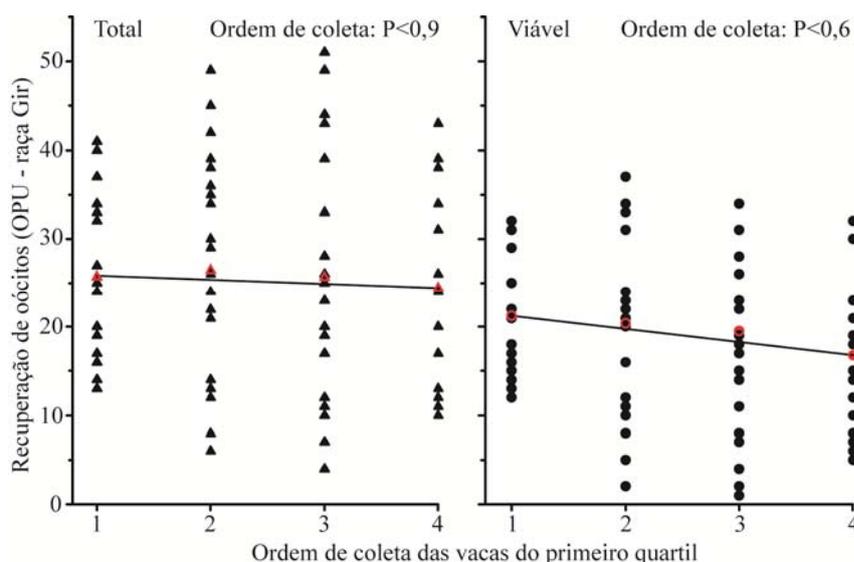


Figura 5. Variação na recuperação de total de óocitos e daqueles classificados como viáveis, de acordo com a ordem de coleta em vacas da raça Gir. Total de quatro coletas no grupo de vacas pertencentes ao primeiro quartil (n=22) quanto à produção de óocitos totais.

Tabela 9 Recuperação de óocitos totais e classificados como viáveis, bem como dos embriões produzidos, de acordo com a ordem de coleta do grupo de animais pertencentes ao 1º quartil.

Ordem de coleta	Total <sup>1</sup>	Viáveis <sup>1</sup>	Embriões <sup>1</sup>
1	25,7 ± 12,2	21,2 ± 10,1	6,0 ± 5,1
2	26,5 ± 12,3	20,4 ± 11,2	4,9 ± 4,1
3	25,6 ± 14,5	19,5 ± 12,8	6,3 ± 5,3
4	24,4 ± 11,2	16,8 ± 8,8	5,4 ± 4,4
<b>Valor P</b>	<i>P</i> <0,9	<i>P</i> <0,6	<i>P</i> <0,5

<sup>1</sup> Número de animais utilizados nesta análise foi de 22.

Resultados semelhantes foram observados para a produção de embriões de acordo com a ordem de coleta dos animais do 1º quartil (Figura 6). Os efeitos da sequência de cada coleta individual e de cada coleta comparada à primeira não foram significativos (*P*<0,6, 1,0 e 0,4, respectivamente). O número de embriões produzidos não variou em função da ordem de coleta das vacas da raça Gir pertencentes ao primeiro quartil.

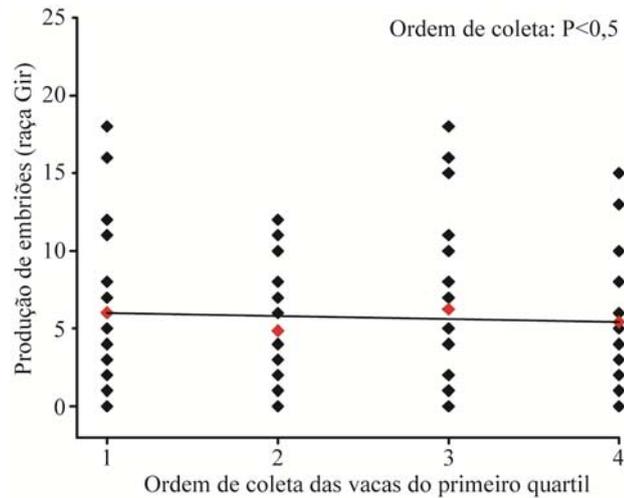


Figura 6. Variação no número de embriões produzidos de acordo com a ordem de coleta em vacas da raça Gir. Total de quatro coletas no grupo de vacas pertencentes ao primeiro quartil (n=22) quanto a produção de oócitos totais.

## 7 – DISCUSSÃO

O presente experimento é parte de um estudo que objetiva caracterizar fenótipos associados ao potencial como doadoras de oócitos para a produção *in vitro* de embriões na raça Gir. Para tal, era necessário caracterizar as variações individuais nas características associadas ao processo, analisando-se também as interrelações dos indicadores parciais de eficiência relativa. O uso de dados de aspirações foliculares, produção de embriões e subsequentes gestações de uma empresa comercial, durante o período de 2008 a 2011, possibilitou esta análise utilizando-se animais de diferentes procedências, seguindo procedimentos convencionais (não experimentais) e em uma escala que facilita extrapolações para a raça como um todo.

Os resultados médios de recuperação de estruturas totais e oócitos viáveis por sessão de aspiração ( $17,8 \pm 12,0$  e  $12,7 \pm 12,0$ ; respectivamente) foram superiores aos previamente relatados para a raça Gir (VIANA *et. al.*, 2004, VIANA *et. al.*, 2008), e mais próximos dos valores observados em raças zebuínas de corte (PONTES *et. al.*, 2011). A diferença de resultados nos trabalhos com a mesma raça pode refletir variações no universo amostral, assim como no protocolo de aspiração ou mesmo no número de sessões a que cada doadora foi submetida. É interessante observar, contudo, que no presente trabalho o resultado individual mais frequente (10 oócitos recuperados/coleta) e a amplitude de variação (1 a 76) são próximos dos valores reportados por outros autores (PONTES, 2011). Desta forma, a maior média observada no presente trabalho pode ser resultante não de diferença intrínseca

nos respectivos universos amostrais, mas da presença ocasional de um maior percentual de animais com elevada produção de oócitos.

No presente estudo, todas as doadoras foram aspiradas após prévia sincronização do crescimento folicular. Desta forma, as coletas foram realizadas, presumidamente, durante a fase de emergência das ondas de crescimento folicular, ou seja, na ausência de folículos dominantes, e seu conhecido efeito deletério sobre a qualidade dos demais folículos (HENDRIKSEN *et. al* 2004). Esta condição poderia sugerir a recuperação de um elevado percentual de oócitos de grau I (melhor qualidade morfológica). Os resultados obtidos, contudo, demonstram a prevalência de oócitos de grau III, que correspondia a 70% dos viáveis. Este resultado pode ser parcialmente explicado pelos danos mecânicos inerentes aos sistemas de aspiração folicular utilizados para a recuperação de oócitos *in vivo*. O tamanho do sistema genital de bovinos e a variação na viscosidade do aspirado requer o uso de circuitos de coleta longos, geralmente maiores que 80 cm, e pressões de vácuo superiores a 60mmHg. O efeito da pressão de vácuo e da configuração do sistema sobre a integridade do complexo cumulus-oócito foi bem caracterizado (BOLS *et. al.* 1997, VIANA *et. al.*, 2005), e resulta principalmente em forças de “shear stress” e atrito que acarretam a perda de células do cumulus. Coerentemente, entre as estruturas classificadas como “não viáveis”, 76,5% eram oócitos desnudos, e apenas 23,5% foram classificadas como atrésicos, resultado diferente do observado em aspirações realizadas aleatoriamente em relação ao ciclo estral (MANIK *et. al* 2003). Da mesma forma, em 50,6% das coletas nenhuma estrutura classificada como atrésico foi recuperada. Estes resultados sugerem que, considerando-se o uso de protocolos de sincronização de ondas foliculares, fatores mecânicos podem ser o principal limitante para a qualidade morfológica dos COCs recuperados. O percentual reduzido, mas relativamente constante de estruturas não viáveis recuperadas, por outro lado, pode refletir também o fato de que a atresia pode ocorrer em qualquer estágio do crescimento folicular, e não apenas por ação dos folículos dominantes (ADAMS 2008). Desta forma, mesmo no início de uma onda de crescimento folicular podem existir folículos em graus variados de atresia, resultando na recuperação de estruturas não viáveis, mesmo quando a aspiração for precedida de algum procedimento de sincronização (CHAUBAL, 2007), folículos estes que podem ser provenientes da onda de crescimento prévia à sincronização.

A taxa de produção de embriões no presente trabalho foi consistente com o relatado por diferentes grupos de pesquisa (PONTES *et. al.*, 2011, TAMASSIA 2003) e também para a PIVE em escala comercial (VIANA *et. al.*, 2010). O número médio de embriões obtidos por

bateria, contudo, é característico de raças zebuína, e superior ao normalmente obtido com raças taurinas (SENEDA, 2005), demonstrando a importância do número de COCs recuperados para a eficiência do processo como um todo e, conseqüentemente, da caracterização prévia do potencial das doadoras a serem utilizadas, objetivo maior do projeto.

A consistência na produção, com 84,4% das baterias produzindo pelo menos um embrião, e a predominância de estruturas classificadas como Grau I (98,60%) em estádios de desenvolvimento mais avançado (BL e BX) indicam que o sistema de produção *in vitro* utilizado foi eficiente e, conseqüentemente, permite inferências sobre a contribuição da quantidade e qualidade intrínseca dos oócitos utilizados na variação observada nos resultados da produção de embriões e subseqüentes gestações. O menor percentual de embriões classificados como blastocistos expandidos era esperado, considerando-se a progressão normal do desenvolvimento embrionário em bovinos e ao fato de que as avaliações foram realizadas no 7º dia do cultivo. Sistemas de cultivo *in vitro* são processos elaborados, nos quais variações na composição dos meios ou nas condições de cultivo podem influenciar não apenas a produção de embriões (LONERGAN e FAIR, 2008), mas também a cinética do desenvolvimento embrionário, a qualidade morfológica e o potencial de desenvolvimento pós-transferência dos embriões produzidos (SENEDA *et. al* 2001). Quando o sistema de cultivo é eficiente, contudo, o principal limitante para a produção dos embriões passa a ser a característica inicial dos oócitos cultivados (SIRARD, 2006).

Como era previsto, embriões classificados como de Grau II resultaram em uma menor taxa de gestação. Pelo sistema de classificação utilizado, embriões Grau II apresentam defeitos morfológicos, como alterações de coloração, extrusão de células, etc., que sinalizam distúrbios metabólicos, de desenvolvimento ou comprometimento de parte da massa celular, o que possivelmente resultou em bloqueio ou retardo do desenvolvimento, impedindo que o mesmo produzisse interferon Tau no momento ou em quantidade suficiente para promover o reconhecimento materno da gestação. Entre os embriões Grau I, contudo, também observou-se diferença nas taxas de gestação, que foram superiores para aqueles em estádios de desenvolvimento mais adiantados (BX e BE) em relação aos menos (Bi e BL). Neste caso, a despeito da inexistência de defeitos morfológicos aparentes, a diferença no estágio de desenvolvimento poderia ser reflexo de alterações no embrião que resultaram em retardo na cinética do desenvolvimento. De fato, a associação entre estágio de desenvolvimento e taxa de gestação subseqüente foi demonstrada para embriões produzidos *in vivo* (VAN, *et. al* 2000) e *in vitro* (FARIN 2001; MERTON 2003). Por outro lado, considerando-se o protocolo de

sincronização utilizado, as receptoras foram inovuladas no equivalente ao dia 8 do ciclo, e embriões em estádios de desenvolvimento mais avançados poderiam resultar em maior sincronia com o ambiente intra-uterino.

O número de COCs recuperados de fêmeas bovinas submetidas à aspiração folicular é uma característica que apresenta elevada variação individual em diferentes raças (SENEDA 2005). Como o número de oócitos recuperados é o principal limitante para o número de embriões obtidos em sistemas *in vitro* (SIRARD *et. al.* 2006, COSTA 2004), caso a variação individual na raça Gir fosse significativa, seria possível investigar a possibilidade do uso desta característica na seleção de potenciais doadoras de oócitos. A classificação dos animais em quartis possibilitou caracterizar a magnitude da variação no número de estruturas totais recuperadas, e a consequente diferença significativa no número de oócitos classificados como viáveis e embriões produzidos. O número de estruturas recuperadas é diretamente relacionado ao de folículos disponíveis para aspiração (VIANA *et. al.*, 2002), que por sua vez pode flutuar em função do status reprodutivo, período do ciclo estral, idade ou por efeito de fatores externos (SENEDA, 2005, HENDRIKSEN 2004). A observação de que o número de oócitos recuperados de um mesmo animal é uma característica de elevada repetibilidade (BONI *et. al.*, 1995), contudo, sugere que a principal fonte de variação seja uma característica intrínseca do animal. A população folicular ovariana também apresenta grande variação individual mesmo em bezerras de até um ano de idade (IRELAND 2008, CUSHMAN 2009, MURASAWA 2005), e poderia ser a causa da variação observada no número de folículos antrais durante a vida adulta. Pouco se sabe, contudo, sobre o padrão de mobilização e crescimento folicular na fase pré-antral, e não há evidências de que raças zebuínas tenham maior número de folículos ao nascimento que raças taurinas. Da mesma forma, a possibilidade de regeneração da reserva ovariana durante a vida adulta continua sendo motivo de controvérsia. Entretanto, independente da razão biológica, a primeira hipótese do trabalho foi confirmada.

A seleção de doadoras baseada no potencial de recuperação de oócitos, contudo, pressupõe não haver diferenças na eficiência de PIVE entre animais dos diferentes quartis. Não foi observada diferença na taxa de gestação de embriões provenientes de oócitos de animais classificados como de maior ou menor produção de COCs. Entretanto, ao se avaliarem as taxas de conversão, observou-se maior produção relativa de embriões a partir de oócitos de animais do 4º quartil, supostamente as piores doadoras considerando-se a produção absoluta. Não há uma explicação aparente para o fato, considerando-se que a expectativa seria

o oposto pelo efeito aditivo dos COCs em cultivo (BRUM 2004). Os resultados do presente trabalho demonstram que produção de oócitos e de embriões são características distintas, e sugerem que a associação positiva entre população folicular e fertilidade, conforme demonstrado na raça holandesa (IRELAND, 2008, IRELAND 2009) pode não ser verdadeira ou ocorrer da mesma forma em raças zebuínas, especialmente na Gir. Desta forma, a segunda hipótese do trabalho foi parcialmente refutada, ou seja, a seleção de doadoras baseada no potencial de recuperação de oócitos resulta em uma aumento absoluto, mas não relativo, na produção de embriões.

Uma limitação na caracterização da distribuição das doadoras em quartis seria a variação na produção entre coletas. Apesar da repetibilidade da característica ser considerada alta (BONI *et. al.*, 1995), outros trabalhos demonstraram redução da produção de oócitos em função da ordem de coleta (TORRES *et. al.*, 2008). No presente trabalho, contudo, esta redução não foi significativa. Podem ter contribuído para esta diferença o fato de que as coletas foram realizadas em intervalos mais longos (15 a 60 dias), o que possibilitaria melhor recuperação das lesões ocasionadas pelo procedimento anterior. Viana *et. al* (2004) observaram redução na taxa de recuperação quando o intervalo de coletas foi reduzido de sete para quatro dias, mesmo na ausência de diferenças significativas na população folicular. Da mesma forma, foram considerados apenas resultados de quatro coletas consecutivas, sendo possível que a manutenção das doadoras em coleta resultasse em queda significativa apenas após um número maior de sessões.

## **8 – Conclusão**

Pode-se estimar o potencial de produção de embriões e gestações pelo número de oócitos recuperados em uma sessão de aspiração, sendo que quanto menor for a quantidade de oócitos obtido maior será o percentual de conversão para as demais etapas, entretanto numericamente quanto maior a recuperação oocitária maior será o número de descendentes deixados pelas doadoras em um programa de produção *in vitro* de embriões. Portanto para se multiplicar o número de descendentes geneticamente superiores aumentando produtividade e lucratividade deve-se optar por doadoras de oócitos que tenham melhores taxas de recuperação oocitária.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology, v. 69, p. 72-80, 2008.

ARMSTRONG, D.T.; *et. al.* Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo productions from calf oocytes. Theriogenology, v.42, p.1227- 1236, 1994.

AVRIL, C. Antral follicle count and oocyte quality. Journal of Gynecology Obstetrics and Biology of Reproduction, v.35, p.2S42-2S43, 2006.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. Journal of Animal Science, v.76, p.1903-1921, 1998.

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

BEG, M.A.; *et. al.* Role of estradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. Reproduction v. 125, p. 847-854, 2003.

BERGFELT, D.R.;*et. al.* Surges of FSH during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle in heifers. Theriogenology, v.48, p.757-768, 1997.

BO, G.A., GUERRERO, D.C., ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology, v. 69, n.1, p. 81-87, 2008.

BONI, *Ret. al.* Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. Theriogenology, v.48, p.277-289, 1997.

BRACKETT, B. G.; *et. al.* Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biology of Reproduction, v.27, p.147-158, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portal do MAPA. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

BROEKMANS FJ, *et. al.* A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod update, v.12 n 6, p.685-718, 2006.

BRUM, D.S.; *et. al.* Volume de meio e número de oócitos para fecundação na produção *in vitro* de embriões bovinos, Archives of Veterinary Science, v. 9, n. 2, p. 61-66, 2004

BUKULMEZ, O.; ARICI, A. Assessment of ovarian reserve. Curr Opin Obstet Gynecol. v.16, n.3, p.231-237, 2004.

BURATINI Jr, J.; *et. al.* Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (Bos indicus) Heifers. Theriogenology, v.54, p.421-431, 2000.

BOLS, P.E.J. *Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications.* 1997. 227f. Thesis Thesis (PhD) - Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Belgium, 1997a.

CHAUBAL. S.A., *et. al.* Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system, Theriogenology, v 67, p 719-728, 2007

CALLESEN, H., GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology, v.27, p.217, 1987.

CAMARGO, L.S.A.; *et. al.* Factors influencing *in vitro* embryo production. Animal Reproduction, v. 3, p. 19-28, 2006.

CENTRO De Inteligência Do Leite. Juiz de Fora, MG. 2006. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/artigos/artigo.php?id=33>> Acesso em: 20 mar. 2009.

CHUN, S.Y.; HSUEH, A.J.W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. Journal of Reproductive Immunology, v.39, p.63-75, 1998.

COBANOGLU, O.; BERGER, P.J.; KIRKPATRICK, B.W. Genome screen for twinning rate QTL in four North American Holstein families. Animal Genetics, v. 36, p. 303-308, 2005.

CROWE, M.A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in cattle. Reproduction Domestic Animals, v.34, n.3, p.157-166, 1999.

CUSHMAN R. A., *et. al.* Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight Jornal Animal Scienci. v 87, p 1971\_1980, 2009

DRIANCOURT, M.A.; *at. al.* Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. Domestic Animal Endocrinology, v.8, p.209-221, 1991.

ECHTERNKAMP, S.E.; *et. al.* Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. Journal of Animal Science. v.82, p.459-471, 2004.

ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. Biology of Reproduction, v.15, n.4, p. 555-560, 1976.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertility and Sterility, v.76, n.5, p.943-949, 2001.

FARIN P.W., CROSIER A.E. FARIN, C.E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology, v.55, p 151\_170 2001;

FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. Reproduction Fertility Development, v.6, p.127-139, 1994.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E.; FRY, R.C. Growth factors in follicular growth of domestic animals. Journal of Reproduction and Development, v.42, p.46-50, 1996. (Suplemento)

GALLI, C.; *et. al.* Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology, v.55, p.1341-1357, 2001.

GIMENES, L.U., *et. al.* Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. Theriogenology v 69 n 7, p 852-858, 2008.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. Theriogenology, v.43, p.689-703, 1995.

GINTHER, O.J., *et. al.* . Association and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. Biol. Reprod., v 68, p 524-529, 2003.

GONG, J.G.; *et. al.* Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. Journal of Reproduction and Fertility, v.105, p.263-270, 1995.

GONG, J.G.; *et. al.*. Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. Biology of Reproduction, v.55, p.68-74, 1996.

GOUGEON, A.; CHAINEY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of woman of different ages. Journal of Reproduction and Fertility, v.81, p.433-442, 1987.

GÜLEKLI, B.; *et. al.* Accuracy of ovarian reserve tests. Human Reproduction, v.14, n.11, p.2822-2826, 1999.

HASLER, J. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. Animal reproduction Science, v.79, p.245-264, 2003.

HENDRIKSEN, P.J.M., *et. al.*, Dieleman, S.J. Effect of different stage of follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology, v.61, p.909-920, 2004.

HINRICHS, K.; KENNEY, D.F.; KENNEY, R.M. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. Theriogenology, v.34, p.107-112, 1990.

HIRSHFIELD, A.N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. Biology of Reproduction, v.50, p.421-428, 1994.

HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; Wrenzycki. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology, v.63, p.1146-1166, 2005.

INVESTINDO Em Minas Gerais. Perfil de Minas Gerais - Principais Setores - Agroindústria. Belo Horizonte (MG), 2006. Disponível em: <<http://www.indi.mg.gov.br/perfil/setores/ai.html>> Acesso em: 28 fev. 2007.

IRELAND, J.L., et. al . Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. Biol Reprod., v. 79, n 6, p 1219-1225, 2008.

Ireland J.J.,et. al ., Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte quality in cattle. Biology of reproduction, v. 80, p.954–964 , 2009.

JOSAHKIAN, L.A. As raças zebuínas no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais... Goiânia, 2005.

KNOPF, L.; et. al. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. Domestic Animal Endocrinology, v.6, p.111-119, 1989.

KULICK, L.J.; et. al. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. Biology of Reproduction, v.65, p.839-846, 2001.

LAMBERT, R.D.; et. al. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. Theriogenology, v.25, p.117-133, 1986.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology, v.51, p.473-485, 1999.

LEROY, J.L.M.R.; BOLS, P.E.J.; VIANA, J.H.M. Technical and biological aspects of ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in the cow: an overview. Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p.103-118, 2005

LONERGAN, P.; et. al.; Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reproduction in Domestic Animals, v.38, p.259-267, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; *In vitro*-produced bovine embryos – Dealing with the warts. Theriogenology, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LOONEY, C.R.; et. al. , D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology, v.41, p. 67-72, 1994.

LOPEZ, H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. Biology of Reproduction, v. 72, p.788-795, 2005.

LOPEZ-GATIUS, F.; *et. al.* Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. Theriogenology, v.63, p.1298-1307, 2005.

LUCY, M.C.; *et. al.* Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. Theriogenology, v.41, p.561-572, 1994.

MANIK, R.S., SINGLA, S.K., PALTA, P., Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle, Animal reproduction Science, v.76, 2003.

MERTON, J.S., *et. al.*, Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry, Theriogenology, v 59, p 651-674, 2003

MIALON,*et. al.*, Genetic relationship between cyclic ovarian activity in heifers and cows and beef traits in males. Genetic, Selection and Evolution, v.33, p.273-287, 2001.

MURASAWA,*et. al.* Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers., Journal of reproduction and development, v 51, n. 5, 2005.

PATTERSON, D.J.; *et. al.*,Evaluation of reproductive traits in Bos taurus and Bos indicus crossbred heifers: relationship of age at puberty to length of the postpartum interval to estrus. Journal of Animal Science, v. 70, p. 1994-1999, 1992.

PEIXOTO, M.G.C.D.;*et. al.* Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. Theriogenology, v.62, p. 1459-1464, 2004.

PENNA, V.M., MADALENA F., ALVIM M. Open MOET nucleus of selection in Guzerá. In: WCGALP, 6, Australia, 1998. Proceedings... Armidale : WCGALP. 1998.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology, v.55, p.1193-1210, 2001.

PIETERSE, M.C.; *et. al.*, Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology, v.30, p.751-762, 1988.

PONTES, J.H.F., *et. al.*, Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors, Theriogenology Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) Acesso em 2011

REIS FILHO, J.C. Endogamia na Raça Gir. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-UFV, Viçosa, 2006.

REICHENBACH, H.D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. Acta Sci. Vet., v.31, p.28-50, 2003.

SARTORELLI, E.S.; *et. al.* Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. Theriogenology, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

SENEDA, M. M.; *et. al.* Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. Animal Reproduction Science, v.67, p.37-43, 2001.

SENEDA, M.M., *et. al.*, Aspiração folicular *in vivo*: metodologias, eficiência e seqüelas, in: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais

SIRARD, M.A.; *et. al.*, Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology, v.65, p.126-136, 2006.

SPLAN, R.K.; CUNDIFF, L.V.; VAN VLECK, L.D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. Journal of Animal Science, v.76, p.2272–2278, 1998.

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

TAMASSIA, M.,*et. al.*, Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. Reproduction , v 126 p- 629-637, 2003

TAYLOR, C.; Rajamahendran, R. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. Canadian Journal of Animal Science, v.71, p.61-68, 1991.

THIBIER, M. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Transfer Newsletter , v.26 n 4, p.4-9, 2008.

TONHATI, H. LOBO, R.B., OLIVEIRA, H.N. Repeatability and herdability of response to superovulation in holstein cows. Theriogenology, v.51, p.1151-1156, 1999.

TRIPP, M.W.; *et. al.*, Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and *in vitro* development. Theriogenology, v.53, p.1581-1590, 2000.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.,*et. al.*, Effect of different reproduction techniques: AI,MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. Theriogenology, v. 53, p 575-597,2000.

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

VIANA, J.H.M.; *et. al.*, Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). Theriogenology, v.57, p.630, 2002.

VIANA, J.H.M., *et. al.*, Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. Animal Reproduction Science, v.84, p.1-12, 2004.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. Acta Scientiae Veterinariae, v.35, p.915-919, 2007.

VIANA J.H.M., *et. al.*, Follicular dynamics in Zebu cattle. Theriogenology, v. 69, p.852–858, 2003.

VIANA J.H.M., *et. al.*, Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up Theriogenology Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) Acesso 02 mar.2010

VIANA, J.H.M, *et. al.*, Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and this effect on Brazilian embryo industry and animal production. Acta scientiae veterinariae, v. 38, p 5661-5674, ago. 2009 (Suplemento 2)