

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FABIANO CARMINATTI ZAGO**

**EFICIÊNCIA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA**

**LAGES - SC**

**2011**

**FABIANO CARMINATTI ZAGO**

**EFICIÊNCIA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal/Recursos Genéticos Animais, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Marcelo Bertolini

**LAGES - SC**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Zago, Fabiano Carminatti

Eficiência de sistemas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos da Raça Flamenga / Fabiano Carminatti Zago ; orientador: Marcelo Bertolini. – Lages, 2011.  
97f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1.Flamenga. 2.Embrião. 3.Bovino. 4.OPU. 5.Biotécnicas de produção. I. Título.

CDD – 636.08926


**FABIANO CARMINATTI ZAGO**

**Eficiência de sistemas de produção *in vivo* e *in vitro*  
de embriões bovinos da raça Flamenga**

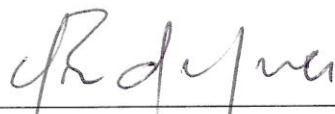
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal/Recursos Genéticos Animais, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

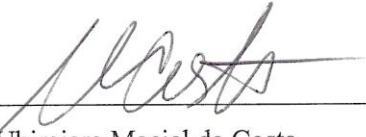
**Banca Examinadora:**

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Marcelo Bertolini  
CAV/UDESC

Membros:

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. José Luiz Rigo Rodrigues  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
CAV/UDESC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Fabiana Forell  
CAV/UDESC

**Lages, SC, 30 de junho de 2011.**

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, a minha esposa Adriana e meus dois filhos Arthur e Enzo, pelo carinho, afeto, compreensão e amor a mim dedicados neste árduo caminho que percorremos juntos. Desculpem as ausências e as noites mal dormidas.

Ao Professor Dr. Marcelo Bertolini, pela orientação, ensino, oportunidade, apoio e amizade incondicionais, dispensadas a mim neste período. Com muito respeito e admiração lhe agradeço mais uma vez.

Ao Professor Dr. Alceu Mezzalira, grande incentivador e pelo apoio conferido para a realização deste trabalho.

A Dra. Fabiana Forell, pelo auxílio, pela amizade e em não medir esforços para me ajudar, realmente deixo aqui registrado meus sinceros agradecimentos.

A minha mãe, meu pai, meus irmãos, meus sobrinhos e minha tia-madrinha, pelo apoio e conforto durante toda esta trajetória, e que, mesmo longe, nunca me deixaram sentir só.

Aos mestrandos e amigos Saul Gaudêncio Neto, Luciana R. S. Marinho, Luis Fernando Schutz, Mônica Urió e também ao Dr. Renato P. C. Gerger e ao Bira pelo incentivo e ajuda em todas as fases do experimento e dissertação. Não tenho palavras para descrever e agradecer o que fizeram por mim.

Aos estagiários e bolsistas do Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem, Luis Henrique Aguiar, Jamir Machado Junior, Pedro Claudino dos Santos Neto, Nerissa Albino, Jéssica Nora Drum, Renata Casali, Maurício Seminotti Zanette, Michelle Federle, Juliana Martins, Matheus Trevisani, Soraya Prodhil Hansen e Alexander de Oliveira

que não mediram esforços em me auxiliar e se tornaram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

A UDESC e à EMBRAPA, pela oportunidade única a mim dispensada.

A EPAGRI, por acreditar que a ciência ainda é a ferramenta para um mundo melhor, mais humano e desenvolvido.

Aos Frigoríficos Verdi e El' Golli pelo auxílio material para a efetivação de parte experimental deste estudo.

Enfim, a Deus, criador de tudo, pela oportunidade e pelos mestres e amigos que colocou no meu caminho.

## RESUMO

Bovinos da raça Flamengo, originários da França, chegaram ao Brasil em 1945 oriundos da Argentina, sendo alocados em Lages, no Estado de Santa Catarina. Esta raça é de dupla aptidão e que, devido à perfeita adaptação às condições edafoclimáticas regionais, acabou compondo inúmeros rebanhos na região Sul do Brasil. Porém, a introdução de raças especializadas no decorrer das últimas décadas ocasionou desinteresse pela raça Flamengo, resultando na redução drástica do rebanho, com cerca de cinquenta animais ainda remanescentes e lotados na EPAGRI de Lages. O risco de extinção imposto a este rebanho e sua importância para a biodiversidade justificam a necessidade de sua preservação. Dentre as biotécnicas reprodutivas que podem ser utilizadas para a expansão desta raça destacam-se a *Ovum Pick Up* (OPU)/produção *in vitro* de embriões (PIV) e a produção *in vivo* de embriões pela múltipla ovulação, inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE). Informações sobre a eficiência de recuperação de oócitos obtidos por OPU para a PIV ou mesmo de embriões produzidos por TE na raça Flamengo são praticamente inexistentes. O objetivo deste estudo foi comparar as eficiências de produção *in vitro* vs. *in vivo* de embriões da raça Flamengo, utilizando-se a raça Holandesa como controle. Oito fêmeas da raça Flamengo e oito da raça Holandesa foram subdivididas em dois subgrupos de quatro animais/raça. Cada subgrupo foi submetido a um bloco de 10 seções de OPU/PIV com intervalo semanal ou a duas seções de TE, em um intervalo de 63 dias. Passado este primeiro período de 63 dias, ambos os procedimentos (OPU/PIV e TE) foram repetidos em um segundo período de 63 dias, invertendo-se os subgrupos de animais para cada procedimento. A OPU foi realizada por ultrassonografia transvaginal para a aspiração de folículos com diâmetro acima de 3 mm. Todos os CCOs foram avaliados morfológicamente e submetidos à PIV, a qual incluiu as etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* até o Dia 7 de desenvolvimento. Para a TE, realizou-se protocolo padrão com doses decrescentes de FSH, seguida de IA, com recuperação de embriões realizados por procedimento não-cirúrgico no dia 7 após a inseminação. Sêmen congelado do mesmo touro da raça Flamengo foi utilizado em todo o experimento. Os dados quantitativos foram analisados pelo PROC MIXED ou pelo teste de Friedman (SAS). Os dados qualitativos foram analisados pelo teste do  $\chi^2$ , e analisou-se os dados de morfologia embrionária e cinética de desenvolvimento pelo teste de Kruskal-Wallis (Minitab), para  $P < 0,05$ . Após 20 seções de OPU/raça, o número total de oócitos viáveis e a média de oócitos/animal/seção na raça Flamengo ( $n=635$  e  $8,0 \pm 0,7$ ) foram superiores à raça Holandesa ( $n=543$  e  $7,3 \pm 0,7$ ), respectivamente. O número médio de blastocistos obtidos por rotina de PIV ( $3,9 \pm 1,5$  vs.  $2,1 \pm 1,2$ ) e a taxa de blastocistos pela PIV (11,8% vs. 7,2%) foram maiores para fêmeas da raça Flamengo se comparadas a fêmeas da raça Holandesa, respectivamente. Após quatro seções de TE (32 coletas/recoletas totais), produziram-se 111 embriões viáveis na raça Flamengo, com média de  $7,5 \pm 1,8$  embriões/fêmea, sendo superior à raça Holandesa, a qual obteve um total de 48 estruturas viáveis, com média de  $3,7 \pm 1,4$  embriões viáveis/fêmea. Desta maneira, conclui-se que as fêmeas Flamengas forneceram mais oócitos viáveis por OPU e mais embriões viáveis por PIV ou TE do que fêmeas Holandesas. Além disso, o procedimento de TE apresentou maior eficiência que a OPU/PIV para a produção de embriões, independente da raça. Contudo, ambas as biotécnicas se mostraram eficazes como ferramentas úteis para a conservação genética de animais da raça Flamengo.

**Palavras-chave:** Flamengo; embrião; bovino; OPU; biotécnicas da reprodução.

## ABSTRACT

The Flemish cattle breed, originally from the Northeast region of France, was imported to Brazil from Argentina in 1945, being allocated to an experimental Station in Lages, State of Santa Catarina (SC). The Flemish is a double purpose breed very well adapted to the altiplane. Such features contributed to a quick dissemination of this breed in the Southern region of Brazil. However, the introduction of more specialized breeds in the past decades caused a loss of interest in the Flemish breed, resulting in a drastic reduction in the herd size, with only about fifty animals still remaining, all located at the EPAGRI Experimental Station in Lages, SC. The high risk of extinction imposed to this small herd, along with its importance to biodiversity, justifies the need for its preservation. For that, the Ovum Pick Up (OPU)/*in vitro* embryo production (IVP) and the multiple ovulation and embryo transfer (MOET) procedures are among the available reproductive biotechnologies that could be readily applied for the maintenance and expansion of the breed. However, data regarding the oocyte retrieval efficiency by OPU and embryo yield either by IVP or MOET for Flemish cattle are still lacking. The aim of this study was to compare the efficiency of the *in vivo* and *in vitro* embryo production systems for the Flemish breed, using Holstein females as control counterparts. Eight multiparous Flemish females and eight Holstein females were allocated to two subgroups of four animals per breed. Each subgroup was subjected to 10 OPU sessions, at weekly intervals, or two MOET protocols, for two periods of 63 days. After the conclusion of one 63-days long period of OPU and MOET sessions, both procedures were repeated in a second period of 63 days, inverting the subgroups of animals for each procedure. The OPU was performed by ultrasonography for the transvaginal aspiration of  $\geq 3$  mm follicles. Recovered oocytes were morphologically graded and subjected to IVP procedures, including the *in vitro* maturation, fertilization and culture steps, up to Day 7 of development. For the MOET subgroups, a standard decreasing FSH dose treatment was used followed by AI, with embryo recovery performed by nonsurgical procedures on Day 7 after AI. Frozen semen from the same Flemish bull was used for the entire experiment. Quantitative data were analyzed using the PROC MIXED or by the Friedman test (SAS), whereas qualitative data were analyzed by the  $\chi^2$  test, and data on the embryonic morphology and kinetics of development by the Kruskal-Wallis test (Minitab), for  $P < 0.05$ . After 20 OPU sessions per breed, a total of 635 viable oocytes were obtained from Flemish females, with  $8.0 \pm 0.7$  oocytes/animal/section, which was significantly higher than from Holstein cows (543 viable oocytes,  $7.3 \pm 0.7$  oocytes/animal/section). The mean number of blastocysts per IVP procedure ( $3.9 \pm 1.5$  vs.  $2.1 \pm 1.2$ ) and blastocyst rates (11.8% vs. 7.2%) were higher in Flemish than in Holstein females, respectively. After four MOET sessions (total of 32 flushings), Flemish females yielded more viable embryos than Holstein animals (111 vs. 48 viable embryos, with  $7.5 \pm 1.8$  vs.  $3.7 \pm 1.4$  embryos/female, respectively). In conclusion, Flemish females yielded more viable oocytes by OPU and more viable embryos by IVP or MOET than Holstein females. Also, MOET procedures were more efficient than OPU/IVP for the production of embryos, irrespective of the breed. Nevertheless, both reproductive biotechnologies, OPU/IVP and MOET procedures, were efficient as useful tools for the genetic conservation of Flemish cattle.

**Keywords:** Flemish; embryo; bovine; OPU; biotechnologies of reproduction.



## LISTA DE ABREVIATURAS

bST	Somatotrofina bovina
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo lúteo
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EEL	Estação Experimental da Epagri de Lages
EG	Etileno glicol
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FOPA	Folículos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IM	Intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPU	<i>Ovum pick up</i>
PIV	Produção <i>in vitro</i>
SEEI	Soro de égua em estro inativado
SFB	Soro fetal bovino
SOFaaci	<i>Synthetic oviduct fluid with amine acids, sodium citrate and myoinositol</i>

SOV	Superovulação
TALP	<i>Tyrode/albumin/sodium lactate/ sodium pyruvate</i>
TCM 199	<i>Tissue culture medium 199</i>
TE	Múltipla ovulação, inseminação artificial e transferência de embriões
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características zootécnicas, nutricionais e produtivas de fêmeas bovinas das raças Flamenga (n=8) e Holandesa (n=8) selecionadas como doadoras para a produção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de embriões bovinos (média ± d.p.).....	39
Tabela 2.	Eficiência da OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça e/ou por período de aspiração.....	50
Tabela 3.	Frequência média por animal (LSM ± SEM) de folículos ovarianos visualizados e efetivamente aspirados por OPU em fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça ou por período de aspiração.....	52
Tabela 4.	Frequência média por animal (LSM ± SEM) de folículos ovarianos visualizados e efetivamente aspirados por OPU em fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa por raça e período de aspiração.....	53
Tabela 5.	Número médio de estruturas recuperadas por animal (LSM ± SEM) após a OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa por raça e/ou por período de aspiração.....	55
Tabela 6.	Número total de estruturas recuperadas por OPU e proporção de recuperação baseada na qualidade oocitária entre as raças bovinas Flamenga e Holandesa e entre os graus de qualidade oocitária conforme classificação morfológica.....	56
Tabela 7.	Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM ± SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça e por período de aspiração.....	58
Tabela 8.	Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM ± SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, independente do período de aspiração.....	59
Tabela 9.	Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM ± SEM) ao longo de dez seções de OPU por período de aspiração, independente do fator racial.....	59
Tabela 10.	Taxas de desenvolvimento embrionário a partir da FIV de COCs de fêmeas bovinas da raça Flamenga e Holandesa utilizados para PIV de embriões.....	60
Tabela 11.	Taxas de desenvolvimento embrionário de COCs de fêmeas bovinas da raça Flamenga e Holandesa utilizados para a PIV de embriões, por período experimental.....	61
Tabela 12.	Eficiência da produção <i>in vivo</i> de embriões após a SOV de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça e/ou por período.....	66

Tabela 13. Taxas de recuperação de estruturas embrionárias após duas lavagens uterinas em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa submetidas a TE.....	67
Tabela 14. Taxas de recuperação de estruturas embrionárias no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina primária (coleta) e secundária (recoleta) de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas.....	69
Tabela 15. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas para a raça, período e seqüência de TE.....	70
Tabela 16. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se o fator raça, período ou seqüência de TE.....	71
Tabela 17. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se a raça, o período e a seqüência de TE.....	73
Tabela 18. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se o fator raça, período e TE individualmente.....	74
Tabela 19. Número de estruturas embrionárias viáveis (mórulas compactas e todos os estádios de blastocistos) recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas.....	75
Tabela 20. Comparação entre estruturas ovarianas, estruturas recuperadas e produção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de estruturas embrionárias viáveis em fêmeas da raça Flamengo e Holandesa de acordo com o sistema de produção de embriões.....	77
Tabela 21. Transferências, prenhezes, nascimentos e banco de germoplasma da raça Flamengo conforme o processo de produção de embriões.....	79

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Número médio de folículos aspirados e CCOs recuperados por animal (LSM  $\pm$  SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamengo e Holandesa, por raça e por período de aspiração. (a) Folículos aspirados, (b) CCOs totais, e (c) CCOs viáveis..... 57
- Figura 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Estádios 4: mórula compacta; 5: blastocisto inicial; 6: blastocisto; 7: blastocisto expandido; 8: blastocisto em eclosão; 9: blastocisto eclodido.  $P < 0.05$ ..... 62
- Figura 3. Taxa de desenvolvimento embrionário (%) por período experimental, após o agrupamento de estádios de desenvolvimento mais precoces e mais avançados, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Estádios 4 a 6: mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto; Estádios 7 a 9: blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido.  $P < 0.05$ ..... 63
- Figura 4. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Qualidade morfológica - Grau I: excelente; Grau II: bom; Grau III: pobre.  $P < 0.05$ ..... 64
- Figura 5. Taxa de desenvolvimento embrionário (%) por período experimental, com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Qualidade morfológica - Grau I: excelente; Grau II: bom; Grau III: pobre.  $P < 0.05$ ..... 64

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Aspectos históricos e produtivos da raça Flamenga.....	19
2.2 Utilização das biotecnologias da reprodução na conservação de recursos genéticos animais em risco de extinção.....	21
2.2.1 Biodiversidade genética e preservacionismo animal.....	21
2.2.2 Quatro gerações de biotecnologias reprodutivas.....	23
2.3 Fatores que interferem na obtenção de oócitos e produção de embriões.....	26
2.3.1 <i>In vivo</i> : Fator “fêmea”.....	26
2.3.1.1 Foliculogênese, reserva folicular ovariana e fator racial.....	26
2.3.1.2 Manipulação e controle hormonal do ciclo reprodutivo e ovariano.....	29
2.3.2 <i>In vitro</i> : fatores ambientais e técnicos e sistemas de obtenção de oócitos para a PIV.....	31
2.3.2.1 Fatores ambientais ou adquiridos.....	32
2.3.2.2 Fatores técnicos.....	32
<b>3. CAPÍTULO ÚNICO –EFICIÊNCIA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA.....</b>	<b>36</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	36
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.2.1 Comitê de ética.....	38
3.2.2 Manejo nutricional dos animais.....	38
3.2.3 Local.....	38
3.2.4 Animais.....	39
3.2.5 Grupos experimentais.....	40
3.2.6 Produção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de embriões.....	40

3.2.6.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	41
a. Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “Ovum Pick Up” (OPU).....	41
b. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	42
c. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	42
d. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	43
3.2.6.2 Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	44
a. Protocolo de múltipla ovulação (SOV), inseminação artificial (IA) e coleta de embriões (TE).....	44
b. Coleta, pesquisa, avaliação e armazenagem dos embriões.....	45
3.2.7 Sincronização do ciclo estral de fêmeas receptoras de embriões e transferência de embriões produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	46
3.2.8 Criopreservação de embriões da raça Flamenga produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	47
3.2.9 Diagnóstico e monitoramento das gestações.....	47
3.3 Análise estatística dos dados.....	48
3.4 RESULTADOS.....	49
3.4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	49
3.4.2 Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	65
3.4.3 Produção <i>in vivo</i> vs <i>in vivo</i> de embriões.....	76
3.4.4 Transferência de embriões, prenhezes e banco de embriões.....	78
3.5 DISCUSSÃO.....	80
3.5.1 Eficiência da OPU/PIV em fêmeas das raças Flamenga e Holandesa.....	80
3.5.2 Eficiência da TE e comparação de eficiência entre os sistemas de produção de embriões para fêmeas das raças Flamenga e Holandesas.....	85
3.6 CONCLUSÕES.....	89
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Bovinos da raça Flamengo, originários da França, foram introduzidos no Brasil no ano de 1945 (ELIAS, 2006), no antigo Posto Zootécnico de Lages, atual Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI). A perfeita adaptação às condições edafoclimáticas sul-brasileiras permitiram que durante anos os animais da raça Flamengo compusessem inúmeros rebanhos nesta região (THALER NETO *et al.*, 1996).

A introdução de raças mais produtivas e especializadas em carne ou leite em rebanhos comerciais nas últimas décadas causou uma diminuição gradual no interesse em animais de raças de dupla aptidão. A raça Flamengo, que possui a característica de produzir carne e leite de forma equilibrada, sofreu uma redução drástica de seu rebanho, e atualmente conta com apenas cinquenta animais puros, lotados na EPAGRI de Lages, em risco de extinção. Devido à importância deste trabalho para a biodiversidade, e ao risco de perda deste recurso genético, justifica-se os esforços para a conservação genética da raça Flamengo.

Pelo menos quatro gerações de biotécnicas da reprodução podem auxiliar na multiplicação de animais, com o enfoque maior no macho (IA), na fêmea (TE, OPU/PIV) ou mesmo em ambos, como a clonagem e a transgenia (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; WAGTENDONK-de LEEUW *et al.*, 2000). A manutenção do rebanho da raça Flamengo em Lages tem quase que exclusivamente potencializado o uso de machos para a disseminação genética por meio da inseminação artificial (IA) com sêmen importado da França ou de touros produzidos na EPAGRI, ou mesmo da monta natural, principalmente para o repasse de fêmeas repetidoras de estro. Porém, em adição à IA, distintas biotécnicas da reprodução animal que maximizem o potencial reprodutivo da fêmea também poderiam auxiliar na diminuição do intervalo entre gerações (HUMBLLOT *et al.*, 2010; MOORE e THATCHER, 2006) nesta raça destacando-se a múltipla ovulação, IA e transferência de embriões (TE), e a produção *in vitro*



(PIV) de embriões através da fecundação *in vitro* (FIV), associada ou não à aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (*Ovum Pick Up*, OPU), ou mesmo da clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Com exceção da TNCS, que apresenta uma baixa eficiência (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009), tanto a TE quanto a OPU-PIV podem apresentar resultados satisfatórios a excepcionais como ferramentas de multiplicação genética em bovinos, o que parece ser mais dependente da origem das raças (*Bos taurus* var. *taurus* vs. *Bos taurus* var. *indicus*) do que do efeito racial propriamente dito (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI *et al.*, 2006).

O Brasil já ocupa espaço destacado no mundo no uso das distintas gerações de biotecnologias reprodutivas, conforme descritas acima, sendo responsável pela transferência de mais de 200 mil embriões produzidos por OPU-PIV em 2008, o que representa 86% da atividade na área no mundo (THIBIER, 2009). Porém, esta atividade em OPU-PIV no Brasil resume-se quase que exclusivamente a raças zebuínas ou cruzas zebuínas, com raças bovinas européias sendo preferencialmente destinadas à TE (PONTES *et al.*, 2009). Isso ocorre principalmente devido à presença de um *pool* maior de folículos de diâmetro reduzido em animais com ascendência zebuína (SEGERSON *et al.*, 1984), o que promove uma maior rendimento na OPU e, por conseguinte, uma maior eficiência na PIV, potencialmente determinando um número maior de produtos nascidos/ano se comparada à TE (HANSEN, 2006). Por outro lado, fêmeas de raças de ascendência européia apresentam uma população folicular menor e conseqüentemente uma eficiência menor na PIV do que as raças zebuínas. Desta forma, a PIV nas raças européias vem sendo utilizada como complemento à TE e outras biotécnicas, em especial para aqueles animais que não respondem adequadamente ao tratamento superovulatório ou que apresentam distúrbios reprodutivos (CALLESEN; LIBORIUSSEN; GREVE, 1996; FABER *et al.*, 2003; THIBIER, 2005). Para a multiplicação eficaz de bovinos em risco de extinção, como a raça Flamenga no Brasil, de ascendência

européia, há a necessidade da determinação da eficiência de uso das biotécnicas reprodutivas como ferramentas auxiliares na multiplicação de animais de interesse. No entanto, informações científicas sobre a dinâmica folicular, da eficiência da OPU-PIV e da TE na raça Flamenga ainda são inexistentes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar as eficiências de produção *in vitro* (OPU/PIV) e *in vivo* (TE) de embriões em animais da raça Flamenga, avaliando-se o número de oócitos recuperados, o número de oócitos viáveis e a quantidade de embriões viáveis produzidos por OPU-PIV e por TE, comparando-se os resultados com animais da raça Holandesa.

Devido ao grande apelo atual em relação à biodiversidade, com este estudo inserido neste contexto, buscamos convergir a missão da EPAGRI em Lages, a necessidade de preservarmos animais puros da raça Flamenga e a oportunidade de comparação da eficiência de biotécnicas reprodutivas, como a OPU/PIV e a TE, a nossa formação acadêmica. Para tal, lançando mão destas duas biotécnicas, conseguimos avaliar o número de oócitos recuperados, o número de oócitos viáveis e a quantidade de embriões viáveis produzidos por OPU-PIV e por TE na raça Flamenga, comparando-se os resultados com animais da raça Holandesa, o que repercutiu no início da caracterização da raça no ponto de vista reprodutivo para fins preservacionistas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E PRODUTIVOS DA RAÇA FLAMENGA**

A raça Flamenga é originária da França e faz parte do grupo de bovinos vermelhos das planícies do Norte Europeu. O registro genealógico da raça em seu país de origem foi estabelecido em 1886. A partir daquele momento, estimava-se que o rebanho Flamengo contava com 25.000 a 30.000 animais. A raça foi praticamente extinta após a 1ª Guerra Mundial, mas com o passar dos anos, a raça retomou força e ganhou novos criadores, sendo que em 1968 já contava com um efetivo aproximado de 230 mil reses, sendo destas, 12 mil inscritas no registro genealógico. Porém, a raça sofreu uma nova retração nas décadas seguintes, com apenas 674 animais estando registrados no *Herd Book* francês em 1988, e 310 animais em 1994 (ELIAS, 2006).

A raça Flamenga foi introduzida no Brasil em janeiro de 1945 através de importação do Ministério da Agricultura brasileiro de animais originários da Argentina (ELIAS, 2006). Este núcleo foi estabelecido no antigo Posto Zootécnico de Lages, sob administração do Ministério da Agricultura, o qual iniciou suas atividades nos idos de 1912. Atualmente, o local sedia a Estação Experimental da EPAGRI de Lages. O primeiro produto nacional registrado desta raça foi uma fêmea de nome “Helíaca de Lages” nascida no dia 03 de julho de 1954 (ELIAS, 2006). Em 1995, ocorreu a única importação de sêmen de touros franceses da raça Flamenga, diminuindo assim a possibilidade de consanguinidade (informação verbal)<sup>1</sup>. Porém, hoje este problema se acentua devido à diminuição do número de doses de sêmen disponíveis desta raça no Brasil e na França e pelo reduzido número de animais existentes, que praticamente derivam dos mesmos ascendentes. Atualmente no Brasil, a raça

---

<sup>1</sup>Informação fornecida por Vilmar Francisco Zardo, Chefe da EEL, 2011.

conta com um efetivo de apenas 50 animais, em todas as categorias de produção, e ao que se tenha conhecimento, todos são mantidos na Estação Experimental da EPAGRI em Lages.

Bovinos da raça Flamenga são animais designados como de dupla aptidão, apresentam predominantemente a cor vermelha acentuada e possuem características importantes do ponto de vista zootécnico, como uma elevada habilidade materna, alta fertilidade, precocidade sexual, longevidade e rusticidade, além de destacada facilidade de parto e maior quantidade de gordura e proteína no leite, com valores médios de 3,94% e 3,42%, respectivamente (ELIAS, 2006). Por suas características produtivas favoráveis, este tipo de animal tem sido recomendado para sistemas de produção com limitação de área (pequenas propriedades), e para o cruzamento com gado geral quando se pretende obter um aumento na produção leiteira (informação verbal)<sup>2</sup>.

Fêmeas da raça Flamenga parecem ter uma produção leiteira e precocidade menores do que animais Holandês, quando em condições semi-intensivas similares. Em estudo de Thaler Neto *et al.* (1996), vacas da raça Flamenga, em sistema de produção de leite à base de pasto com pequena suplementação de concentrado, produziram em média 3.959 kg de leite aos 305 dias, analisando-se 104 lactações de 57 vacas, com vacas holandesas produzindo 4.763 kg de leite, ou seja, 24,5% a mais na produção leiteira. Naquele estudo, a raça Flamenga apresentou um desempenho 8% menor em relação ao período de lactação de vacas da raça Holandesa. Em adição, constatou-se que vacas da raça Flamenga atingiram o pico de produção em lactações aos 96 meses de idade, diferentemente da raça holandesa, que apresenta este índice aos 69 meses de idade. Já em seu país de origem, vacas da raça Flamenga produziram em média 6.463 kg de leite em 314 dias de lactação (ELIAS, 2006).

---

<sup>2</sup>Informação fornecida por Vilmar Francisco Zardo, Chefe da EEL, 2011.

## **2.2 UTILIZAÇÃO DAS BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS EM RISCO DE EXTINÇÃO**

### **2.2.1 Biodiversidade genética e preservacionismo animal**

Durante as últimas décadas ocorreram avanços extraordinários nas técnicas de reprodução assistida em mamíferos. Em 1784, o abade Lazzaro Spallanzani, realizava os primeiros experimentos em FIV, em anfíbios. Neste mesmo ano, Spallanzani obteve o primeiro produto oriundo de IA em mamíferos, na espécie canina (FOOTE, 2002), após determinar o papel dos espermatozóides (animálculos) na fecundação. A partir daí, novos trabalhos e investigações vem possibilitando o desenvolvimento de novas biotecnologias, gerando inúmeras possibilidades para sua utilização, para o aumento na produtividade e produção animal (WAGTENDONK-de LEEUW, 2006).

A extinção de espécies animais no decurso da vida em nosso planeta faz parte do processo natural de evolução, e uma vez ocorrido, é irreversível. Porém, a extinção pela mão do homem está ocorrendo em processo acelerado para muitas espécies animais e vegetais no planeta (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Atualmente, existem cerca de 162 espécies de mamíferos ameaçadas de extinção e 70 espécies praticamente extintas, sendo destas, quatro espécies extintas no seu habitat natural (ANDRABI e MAXWELL, 2007).

A introdução de espécies especializadas na produção de subprodutos é um fator importante para a perda da biodiversidade (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000; BURRIEL *et al.*, 2007). Geralmente animais de uma mesma raça são selecionados para as mesmas características fenotípicas ao longo das gerações, elevando sobremaneira a pressão de seleção sobre este rebanho (TABERLET *et al.*, 2008), o que promove drástica perda da

variabilidade genética (ROOSEN; FEDLAOUI; BERTAGLIA, 2005; LEON-QUINTO *et al.*, 2009).

O objetivo da conservação de pequenos rebanhos ou grupos de animais em extinção é manter e, se possível, aumentar a biodiversidade (LEON-QUINTO *et al.*, 2009). Programas de conservação *in situ* e *ex situ* visam à manutenção da biodiversidade animal, e dependem diretamente do desenvolvimento e do domínio das biotecnologias reprodutivas. Porém, os programas de conservação genética necessitam de condições específicas para funcionarem adequadamente, principalmente em relação à área no habitat original de espécie ou raça a preservar (TABERLET *et al.*, 2008). A abordagem ideal para atingir este objetivo é através da preservação do habitat natural (LOI *et al.*, 2001). No entanto, as estratégias de conservação *in situ* são, muitas vezes, insuficientes para a propagação destas pequenas populações, bem como para a manutenção da diversidade genética adequada (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000). Uma alternativa bastante difundida para diminuir estes inconvenientes é a criopreservação de gametas, embriões e células, metodologia que permite a formação de bancos de germoplasma animal (HOLT e PICKARD, 1999; McEVOY *et al.*, 2006), auxiliando assim a manutenção de espécies ou raças em risco de extinção (ANDRABI e MAXWELL, 2007), além de possibilitar o processamento de material biológico para usos diversos, como a clonagem e a transgênese (LEON-QUINTO *et al.*, 2009). Neste mesmo contexto de manutenção da biodiversidade, a criopreservação de oócitos possibilita uma gama maior de utilizações, porém com uma viabilidade menor se comparado a embriões (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Não obstante, antes de podermos criopreservar gametas, embriões e células necessita-se do conhecimento da fisiologia da reprodução de cada espécie de interesse e da possibilidade de aplicação de distintas biotecnologias da reprodução que podem, em diferentes níveis, assegurar o sucesso nos programas de preservação genética animal.

### 2.2.2 Quatro gerações de biotecnologias reprodutivas

Desde o marco histórico de Walter Heape, de abril de 1890, que produziu o primeiro mamífero por meio de coleta e transferência de embriões (HEAPE, 1890; BETTERIDGE, 2003), uma gama enorme de outras biotécnicas foram desenvolvidas e utilizadas principalmente para aumento da produção (GALLI *et al.*, 2003; FABER *et al.*, 2003), mas também como ferramenta para a conservação genética animal (BETTERIDGE, 2006). Os avanços biológicos e tecnológicos observados principalmente durante as últimas seis décadas, ou durante o pós-2ª Guerra Mundial, geraram o desenvolvimento gradual de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida (THIBIER, 2005). Historicamente, além da mera curiosidade científica, o surgimento e o desenvolvimento das tecnologias reprodutivas têm sido impulsionados pelo ganho econômico oferecido pelo possível aumento do número de descendentes de animais geneticamente superiores ou, simplesmente, para salvaguardar o patrimônio genético dos animais inférteis ou subférteis (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009). Por um lado, as tecnologias reprodutivas foram desenvolvidas para oferecer possibilidades de uma maior utilização de germoplasma superior (MOORE e THATCHER, 2006). Por outro lado, as tecnologias de reprodução assistida têm fornecido a base necessária à pesquisa científica para a compreensão de complexos mecanismos fisiológicos da fêmea e do macho e os seus ciclos reprodutivos. Com o surgimento de novas descobertas, novas perspectivas e aplicações são propostas, testadas, refinadas e, finalmente, colocadas em prática. Desta forma, o uso de técnicas de reprodução assistida tem sido de grande importância na produção pecuária (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; MOORE e THATCHER, 2006; THIBIER, 2005).

Em termos gerais, as três primeiras gerações de biotecnologia da reprodução, incluem (1) a IA e a congelação de gametas e embriões; (2) a TE, com a evolução também da ultrasonografia; e (3) a FIV. Todos estes procedimentos amadureceram em aplicações

comerciais bem sucedidas, facilitando o aumento da produção através da genética, a redução do intervalo entre gerações, o controle de enfermidades e a redução dos custos de produção (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; THIBIER, 2005). A quarta geração de biotecnologias engloba os processos que estão ainda no nível mais experimental, que inclui a clonagem por transferência nuclear com células embrionárias ou somáticas, a transgênese, a biologia das células-tronco e a sexagem de espermatozoides e embriões. Com o uso das biotecnologias avançadas de reprodução (quarta geração), tem-se o potencial de aumentar a influência de animais superiores na produção, mas as suas aplicações comerciais têm sido limitadas (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009). O advento das ferramentas moleculares, do diagnóstico molecular e da biologia de sistemas trouxe à tona um patamar de desenvolvimento que promete alavancar ainda mais o nosso conhecimento dos sistemas biológicos, o que seguramente irá se traduzir em benefícios à produção animal e à saúde humana ainda maiores dos que hoje são observados. Além disso, o uso de genômica, proteômica, metabolômica e bioinformática no estudo de reprodução vai permitir uma maior compreensão das limitações de eficiência nos processos reprodutivos (MOORE e THATCHER, 2006). No entanto, muitos desafios ainda dificultam o desempenho reprodutivo máximo de animais nos sistemas produtivos, afetando a produtividade e lucratividade. É claro que a aplicação das tecnologias reprodutivas como atividades lucrativas permanecerá questionável se não for associada a outros componentes da produção animal, como a saúde animal, nutrição e práticas de criação adequadas (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; THIBIER, 2005).

O conhecimento da fisiologia reprodutiva e o desenvolvimento de equipamentos auxiliares para utilização na prática animal, como os de ultrassonografia e laparoscopia, por exemplo, além do avanço da estrutura laboratorial, trouxeram outra dimensão para a aplicação das novas biotecnologias no setor produtivo. Avançadas biotecnologias da reprodução como a TE, a OPU/PIV, sexagem de embriões e sêmen, injeção intracitoplasmática de



espermatozóides (ICSI) e a clonagem por transferência nuclear são, sem dúvida, ferramentas importantes para a multiplicação genética com enfoque comercial ou mesmo preservacionista, pela diminuição da perda da diversidade genética contida em raças e espécies animais de menor interesse global (ANDRABI e MAXWELL, 2007; BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; MOORE e THATCHER, 2006).

As tecnologias reprodutivas são interligadas entre si, sendo totalmente interdependentes. Por exemplo, a combinação de TE que utiliza-se da IA para a produção de embriões, representa para a fêmea relativamente o que a IA tem sido para o macho, permitindo a produção de descendentes de várias fêmeas geneticamente superiores (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009). Da mesma forma, a OPU-PIV tem se tornado uma biotécnica de intensa aplicação para a espécie bovina (GALLI *et al.*, 2001), ou pelo menos em algumas raças, como as zebuínas, tanto para a multiplicação animal, quanto para a conservação de recursos genéticos. Em adição, a possibilidade de obtenção de oócitos recuperados *in vivo* de fêmeas pré-púberes, inférteis ou mesmo prenhez torna esta tecnologia extremamente versátil e com cunho importante tanto comercial quanto para a conservação genética (FABER e FERRER, 2004; BETTERIDGE, 2006).

A aplicação das biotecnologias da reprodução para a preservação de espécies ou raças animais, como a Flamenga, depende das características do *pool* genético que se deseja preservar (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000). A utilização da criopreservação de sêmen para a IA potencializa tremendamente o uso de machos existentes como reserva genética. Porém, nem sempre se dispõem de reprodutores hígidos, em número ou de qualidade genética necessários para a utilização como disseminadores de genes (HIEMSTRA; LENDE; WOELDERS, 2005). Portanto, torna-se claro que a utilização adicional do potencial da fêmea como reserva genética ocupa papel chave na preservação da biodiversidade genética, em especial para raças como a Flamenga, de dupla aptidão, mas com forte vocação

leiteira. Para tanto, a aplicação da segunda e terceira gerações das biotecnologias reprodutivas, em associação ao uso de sêmen congelado para a IA ou PIV, dependem do entendimento dos fatores que interferem na obtenção de gametas e embriões na espécie ou raça de interesse (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000).

## **2.3 FATORES QUE INTERFEREM NA OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

### **2.3.1 *in vivo*: Fator “fêmea”**

Vários fatores como a sanidade e o estado nutricional do rebanho, as técnicas e equipamentos utilizados, as doses inseminantes, e o manejo dos animais, podem interferir na obtenção e na qualidade de gametas e embriões, contudo, estas variáveis podem ser controladas adequadamente (BARROS e NOGUEIRA, 2001; ALLER *et al.*, 2010). Não obstante, o fator “fêmea” é normalmente um dos mais determinantes da eficiência reprodutiva nos rebanhos e, principalmente, na aplicação de biotecnologias da reprodução.

#### **2.3.1.1 Foliculogênese, reserva folicular ovariana e fator racial**

Ovários são glândulas pareadas repletas de folículos, estando suspensos na parede dorsal do abdômen pelo mesovário e que determinam o desenvolvimento dos oócitos e a produção de hormônios (REECE *et al.*, 2008). O ovário é dividido didaticamente em três partes: a primeira parte dividida em epitélio tipo pavimentoso e/ou cilíndrico e a túnica albugínea, camada de tecido conjuntivo denso que recobrem a parte externa do ovário; córtex, que compreende uma massa de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento; e finalmente a medula ou estroma, formado de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos e tecido nervoso.

Primordialmente, o desenvolvimento dos ovários fetais depende da migração de células germinativas primordiais oriundas do saco vitelínico para a crista genital, o que ocorre entre o dia 28 a 32 de gestação (AERTS e BOLS, 2010 *apud* RUSSE e SINOWATZ, 1991), sendo que estas células povoam a região cortical das gônadas embrionárias (STABENFELD e DAVIDSON, 2004). Estas células, posteriormente à migração, formam as células foliculares e as da granulosa, que circundam o oócito (THIBAUT; LEVASSEUR; HUNTER, 1993) e a parte mesenquimal da crista genital dará origem então, posteriormente, às células da teca (FORTUNE, 2003).

Os folículos ovarianos são as unidades morfofuncionais dos ovários e podem ser classificados em folículos pré-antrais (FOPA), sendo aqueles que não possuem antro (cavidade repleta de líquido folicular que circunda o oócito), e antrais (SANTOS *et al.*, 2008).

Os FOPA constituem-se basicamente de um oócito circundado por células da granulosa e dividem-se em: a) primordiais, que apresentam apenas uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa e estão em estado de quiescência; b) primários, que são formados por um oócito também circundado por uma única camada de células da granulosa, porém em formato cubóide e podem apresentar zona pelúcida em formação; c) secundários, caracterizam-se pela presença de um oócito circundado pela zona pelúcida e pelo menos duas camadas de células da granulosa de morfologia cubóide (KATSKA e RYNSKA, 1998; MATOS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008). Tanto nos folículos primários quanto nos secundários os oócitos são primários, encontrando-se na prófase I da meiose I. Conforme van Wezel e Rodgers (1996), o início do crescimento folicular ocorre com a ativação folicular, que consiste da transição de folículos primordiais para primários através da proliferação e diferenciação da forma das células da granulosa de achatada para cubóide concomitante com o aumento de volume dos oócitos. A grande maioria destes folículos primários evolui para a fase antral, caracterizada previamente pela formação da membrana basal, que separa a teca

interna das células da granulosa, seguida pela formação de uma cavidade (antro) e pela presença da camada de células do *cumulus oophorus* que envolve o oócito (AERTS e BOLS, 2010).

Os folículos antrais podem ser classificados em terciários (subordinados a dominantes) e pré-ovulatórios ou de Graaf (SANTOS *et al.*, 2008). Ambos já apresentam *corona radiata*, células do *cumulus oophorus*, células da granulosa e células da teca interna e externa (FORTUNE, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; SCHOEVERS; COLENBRANDER; ROELEN, 2007).

Na espécie bovina, o estoque de folículos primordiais se desenvolve durante a vida fetal (AERTS e BOLS, 2010) e está intimamente ligado ao estado nutricional da fêmea gestante, especialmente no terço inicial de gestação, onde vacas que sofrem certa restrição alimentar originam filhas com uma menor população folicular quando comparadas a fêmeas que não passaram por restrição (EVANS *et al.*, 2010). Aos 110 dias de gestação, o número médio de folículos nos ovários de um feto bovino é de aproximadamente  $2,7 \times 10^6$  (BOLS *et al.*, 1997), decrescendo até o nascimento para cerca de 130.000 FOPA, por meio de processos degenerativos, apoptóticos ou atrésicos, sendo que a estimativa é de que apenas 0,1% destes oócitos cheguem à ovulação (GORDON, 2003).

Segundo Ireland *et al.* (2011), a quantidade de folículos e oócitos nos ovários é muito variável ao longo da vida reprodutiva de bovinos. Segundo o autor, há evidências de que vacas com uma contagem de folículos antrais relativamente baixa têm inúmeras características fenotípicas geralmente associadas à infertilidade. À contagem de folículos antrais é associada positivamente com o tamanho do ovário e quantidade total de folículos e oócitos em ovários de animais adultos jovens, sendo que vacas com um baixo número médio de folículos antrais geralmente respondem mal à superovulação (EVANS *et al.*, 2010; IRELAND *et al.*, 2011). Outra hipótese a ser considerada é a renovação folicular, defendida

por Johnson *et al.* (2004, 2005). Contudo este novo conceito precisa ser melhor investigado antes de ser considerado uma realidade.

O fator racial parece influenciar dramaticamente o sucesso na recuperação de oócitos a partir da OPU. Animais de raças zebuínas (*Bos taurus* var. *indicus*) apresentam um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas de raças européias, ou *Bos taurus* var. *taurus* (DAYAN; WATANABE; WATANABE, 2000). Por este motivo, muitos autores relatam uma maior quantidade de oócitos recuperados por aspiração de animais zebuínos quando comparados a taurinos (PONTES *et al.*, 2009; SENATORE *et al.*, 2010), o que parece ter impulsionado o Brasil para a liderança na aplicação da OPU-PIV em bovinos com relação ao resto do mundo (THIBIER, 2009). Interessantemente, em recente estudo realizado por Pontes *et al.* (2011), não foram encontradas diferenças entre o número de folículos pré-antrais (primordiais, primários ou secundário) em ovários de fetos de novilhas *Bos taurus* var. *indicus* ou *Bos taurus* var. *taurus*, sugerindo que o número total de folículos não foi a razão para a diferença de rendimento na produção de oócitos em programas de OPU/PIV, sendo que isto pode estar associado a taxa de atresia folicular menor em vacas *Bos taurus* var. *indicus*.

#### 2.3.1.2 Manipulação e controle hormonal do ciclo reprodutivo e ovariano

A resposta de fêmeas bovinas aos tratamentos hormonais em procedimentos superovulatórios para coleta de embriões apresenta uma variabilidade expressiva, sendo um dos maiores problemas nos programas de transferência de embriões, tanto na área comercial, quanto para a preservação de recursos genéticos (BARUSELLI *et al.*, 2006). A variabilidade na quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vivo* pela TE parece estar mais relacionadas ao fator animal, com ênfase especial ao ambiente uterino (GALLI *et al.*, 2003). Afecções como endometrites e salpingites podem prejudicar ou até mesmo impossibilitar a produção de embriões por esta metodologia (LUCY *et al.*, 2001).

Diferentes protocolos de estimulação ovariana e de controle do ciclo reprodutivo e ovariano e diferentes doses de fármacos foram e continuam sendo testados para otimizar a produção *in vivo* de embriões (THATCHER *et al.*, 2001; BÓ *et al.*, 2010), já tiveram como foco o controle do crescimento folicular e o momento da ovulação (LUCY *et al.*, 2004). Contudo, parece que os protocolos recomendados ainda sofrem com variáveis intrínsecas aos animais, onde as respostas aos protocolos de superovulação permanecem em patamares relativamente estagnados há anos (COSTA; SILVA; SILVA, 2001; BÓ; GUERRERO; ADAMS, 2008). Dentre as drogas utilizadas para determinar a ovulação múltipla estão a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), muito utilizada no passado, e o hormônio folículo estimulante (FSH), este último proveniente da purificação a partir do extrato de pituitárias de suínos, ovinos e equinos (BÓ; GUERRERO; ADAMS, 2008).

Muitos trabalhos evidenciaram que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório pode determinar uma diminuição da produção de embriões *in vivo* (GUIBAULT *et al.*, 1991; LUSSIER; LAMOT; PACHOLEK, 1995). Para evitar tal inconveniente, pesquisadores como Goulding *et al.* (1990) e Roberts; Grizzle; Echterkamp (1994) preconizaram a utilização de FSH no primeiro dia do ciclo estral, ou seja, sem a presença do folículo dominante. A aspiração ou ablação do folículo dominante também foi proposta por Bergfelt; Lightfoot; Adams (1994) e por Bodensteiner *et al.* (1996) como alternativa para o início do protocolo de superovulação (SOV) sem a presença do folículo dominante. Outra maneira bastante difundida para início de protocolos de SOV seria sincronizar o início das ondas foliculares, evitando-se assim a presença do folículo dominante, o que tem sido amplamente utilizado atualmente (BÓ *et al.*, 1995; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). Não obstante, protocolos hormonais para estimulação de múltipla ovulação com respostas previsíveis e elevadas para a maioria das fêmeas doadoras ainda são elusivos em bovinos.

Em adição à variabilidade na taxa ovulatória após tratamentos superovulatórios, destaca-se também a variabilidade observada nas taxas de recuperação embrionária após a coleta de embriões de fêmeas doadoras. Um procedimento interessante utilizado para melhorar os índices de recuperação de embriões produzidos *in vivo* é a recoleta ou dupla lavagem uterina, que consiste em uma nova lavagem uterina em um período de aproximadamente 30 min após coleta primária (CASTRO NETO *et al.*, 2005). Um dos aspectos deste processo, e que o diferem de relatos de tentativas anteriores de recoleta, é o fato de haver o preenchimento dos cornos uterinos com meio de coleta antes da liberação do animal, para a execução da segunda lavagem uterina subsequente. Com este procedimento, Castro Neto *et al.* (2005) e Cruz *et al.* (2008) conseguiram aumentar a eficiência da recuperação de estruturas, que muitas vezes poderiam ficar retidas e por conseguinte perdidas no trato reprodutor da fêmea.

### **2.3.2 *in vitro*: Fatores ambientais e técnicos, e sistemas de obtenção de oócitos para a PIV**

A aspiração folicular transvaginal *in vivo* de ovários de fêmeas bovinas, descrita pela primeira vez por Pieterse *et al.* (1988), foi desenvolvida por adaptação desta mesma técnica desenvolvida para humanos. Este procedimento primeiramente foi recomendado para animais com alto potencial genético como alternativa à TE (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; FABER e FERRER, 2004). Porém, a PIV de embriões pela OPU torna possível a utilização de animais jovens e senis, de fêmeas em início de gestação, em período pós-parto inicial, em doadoras que não respondem à SOV ou em fêmeas inférteis (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; FABER e FERRER, 2004).

### 2.3.2.1 Fatores ambientais ou adquiridos

Katska e Smorag (1984), trabalhando com ovários de matadouro, não encontraram diferenças na qualidade dos oócitos entre animais jovens (a partir de 18 meses) e senis (até 17 anos), embora tenham notado redução na produção de gametas nos animais mais senescentes. Looney *et al.* (1994) relataram a possibilidade de aspiração folicular em animais bastante jovens, mesmo pré-púberes. De fato, Brogliatti e Adams (1996) obtiveram oócitos de bezerras com apenas 6 semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. No entanto, animais jovens (pré- ou peri-púberes) produziram oócitos com reduzida competência para o desenvolvimento embrionário até blastocisto após a PIV (REVEL *et al.*, 1995). Por outro lado, Meintjes *et al.* (1995) constataram que vacas gestantes podiam ser submetidas à técnica durante o primeiro trimestre de prenhez, enquanto Sauvé (1998) demonstrou viabilidade na OPU-PIV em fêmeas até o sexto mês de prenhez, sem que fosse percebido qualquer prejuízo à prenhez ou às fêmeas.

Parece haver um consenso quanto ao escore de condição corporal das fêmeas doadoras submetidas à OPU, com animais subnutridos fornecendo oócitos com menor capacidade de desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto (RUIZ *et al.*, 1996). Em adição, animais submetidos a situações de estresse também seriam doadores de oócitos com menor competência para a PIV de embriões (SENEDA *et al.*, 2000).

### 2.3.2.2 Fatores técnicos

No ponto de vista técnico, as primeiras agulhas utilizadas na OPU eram as do tipo longas, não descartáveis e produzidas especificamente para este fim (PIETERSE *et al.*, 1988). Este tipo de agulha apresentava à época um alto custo e rápida perda do “fio”, prejudicando sobremaneira a recuperação dos oócitos (BOLS *et al.*, 1995). A utilização de agulhas “cegas”



diminuiu a capacidade de penetração nos tecidos, podendo implicar em lesões maiores durante a punção, em especial ao estroma e à região peri-ovariana, ocorrendo a posterior cicatrização e formação de tecido fibroso. Outro aspecto negativo é a menor recuperação de oócitos, pela não perfuração do folículo de forma rápida e precisa. Desta maneira, Bols *et al.* (1997) demonstraram a viabilidade da utilização de agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) e 50 mm de comprimento. Os autores também verificaram o comprimento do bisel da agulha e a taxa de recuperação de oócitos. Acreditava-se que as agulhas com bisel curto apresentariam melhores taxas de recuperação, pela facilidade de serem introduzidas no folículo. Entretanto, ao contrário do que se esperava, as agulhas de bisel longo apresentaram melhor recuperação e qualidade de oócitos, possivelmente, por serem introduzidas de forma mais rápida e precisa, evitando-se o extravasamento de conteúdo folicular. Atualmente, preconiza-se a utilização de uma agulha para cada fêmea, ou mesmo por ovário, em especial naqueles animais com um maior número de folículos aspiráveis. Desta forma, o procedimento de recuperação dos oócitos pode ser realizado com mínimos danos ao estroma ovariano (SENEDA e BALSCHI, 2004).

Outro aspecto essencial na aspiração folicular e que está diretamente ligado à quantidade e qualidade dos oócitos é a pressão negativa (vácuo) utilizada durante a OPU. Historicamente, a pressão utilizada tem sido expressa em milímetros de mercúrio (mm Hg), variando de -40 a -400 mm Hg, embora, na prática, esta pressão seja relativa, já que fatores como o diâmetro e o comprimento das conexões, a localização do equipamento de vácuo e o diâmetro da agulha, interfiram diretamente nestes valores. Bols *et al.* (1996) demonstraram que pressões baixas (-50 mm Hg) foram pouco efetivas na recuperação dos oócitos, e que pressões elevadas (-120 mm Hg), diminuíam a qualidade dos oócitos, aumentando o número de oócitos desnudos após a coleta. Atualmente, uma forma mais prática e realista de se quantificar a pressão negativa é através da mensuração da quantidade de fluido aspirado por

minuto (PIETERSE *et al.*, 1988). Muitos autores relatam como o intervalo mais adequado entre 10 e 20 mL de fluido por minuto (ALLER *et al.*, 2010).

As primeiras aspirações foliculares *in vivo* em bovinos foram realizadas com sucesso utilizando transdutores setoriais (PIETERSE *et al.*, 1988), com a posterior adaptação de transdutores lineares (SENEDA *et al.*, 2003). Bols *et al.* (1996) relataram a utilização de transdutores convexos ou setoriais para aplicação na OPU, apresentando vantagens em relação aos transdutores lineares. O espaço limitado entre o transdutor linear e a agulha de punção dificulta a aspiração livre e fácil de todas as regiões do ovário, mesmo quando modificado o posicionamento da gônada, tornando a realização do processo dificultada e menos eficiente. Hashimoto *et al.* (1999) citaram o uso de diferentes frequências de transdutores para a OPU, variando de 3,5; 5,0; 6,5; e 7,5 MHz, apresentando os melhores resultados com transdutores de frequências de 6,5 e 7,5 MHz.

O intervalo entre as sessões de aspiração folicular *in vivo* também parece influenciar a quantidade e a qualidade de oócitos coletados (MERTON *et al.*, 2003). Animais aspirados uma ou duas vezes por semana tendem a ter uma diminuição do número de folículos de tamanhos menores e aumento do número de folículos de tamanhos maiores com o passar do tempo (ROOVER *et al.*, 2008). Hasler *et al.* (1995), aspirando oócitos de fêmeas Holandesas semanalmente, observaram uma tendência a diminuição do número de oócitos após sessões repetidas de aspiração em uma mesma doadora, onde utilizando 6 fêmeas, observaram que nas 5 primeiras aspirações obtiveram uma média de 8,6 oócitos por animal, e nas 5 últimas sessões aspiraram apenas 4,0 oócitos por doadora.

Alguns resultados de campo têm demonstrado que a qualidade dos oócitos não se altera com a fase do ciclo estral ao qual a doadora se encontra (SENEDA e BALSCHI, 2004). No entanto, o número de folículos disponíveis para a aspiração apresenta considerável variação, sendo o início de onda o momento mais favorável para a execução da OPU, pelo

maior número de folículos aspiráveis e pela melhor eficiência de captação dos oócitos (SENEDA *et al.*, 2001).

Pieterse *et al.* (1988) e Goodhand *et al.* (1999) relataram uma melhor taxa de recuperação de oócitos quando predominavam folículos pequenos no ovário, e menor recuperação de oócitos por sessão quando havia o predomínio de folículos maiores que 6 mm de diâmetro. A relação inversa entre um maior diâmetro folicular e a taxa de recuperação de oócitos por sessão tem sido relatada por diversos pesquisadores e justificada de diversas formas, como alterações morfológicas nos complexos *cumulus*-oócito (CCO), viscosidade do fluido folicular, quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular (SENEDA e BALSCHI, 2004).

Considerando-se os aspectos técnicos e fisiológicos, Aller *et al.* (2010) reconhecem que o momento mais eficaz para a realização da OPU é no início da onda de desenvolvimento folicular. Os mesmos autores comentam que, com a utilização de programas de sincronização da onda folicular, pode-se controlar a presença de folículos pequenos e o crescimento folicular, pelo uso de gonadotrofinas, como o FSH, eCG ou mesmo da somatotrofina bovina (bST).

### **3. CAPÍTULO ÚNICO**

## **EFICIÊNCIA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

A extinção de algumas espécies de mamíferos é parte do processo natural da evolução (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Porém, nas últimas décadas ocorreu uma rápida perda da diversidade genética animal principalmente devido à extinção de algumas espécies e raças animais, sendo que atualmente cerca de 40 espécies animais formam a base da produção animal no mundo (LONG, 2009). Neste contexto de despreocupação com a redução de recursos genéticos, o homem vem buscando o aumento da produção de subprodutos derivados da espécie bovina, o que promove indiretamente a diminuição gradativa da capacidade reprodutiva com índices de fertilidade menor (HASLER, 2006), traduzindo-se em menor número de animais produzidos (CHAGAS *et al.*, 2007; ETHERINGTON; KINSEL; MARSH, 1996).

O Brasil, em função de sua dimensão continental e das particularidades nas distintas regiões, é portador de uma das mais amplas biodiversidades do mundo. Entretanto, importantes perdas de espécies, raças e genótipos tem ocorrido nos últimos anos. Em Santa Catarina existem rebanhos naturalizados que estão em risco de extinção, como a raça bovina Flamengo, os quais poderiam ser utilizados tanto para conservação de recursos genéticos e perpetuação de suas características, como de forma comercial. Bovinos da raça Flamengo, originários da França, foram introduzidos no Brasil no ano de 1945 (ELIAS, 2006), no antigo Posto Zootécnico de Lages, atual Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI). A perfeita adaptação às condições edafoclimáticas sul-brasileiras permitiram que durante anos os animais da raça

Flamenga compusessem diferentes rebanhos nesta região (THALER NETO *et al.*, 1996). Porém, a introdução de raças mais produtivas e especializadas em carne ou leite em rebanhos comerciais nas últimas décadas causou uma diminuição gradual no interesse em animais da raça Flamenga, que possui a característica de dupla aptidão, com a capacidade de produção de carne e leite de forma equilibrada. Devido ao desinteresse pela raça, ocorreu uma redução drástica de seu rebanho, o qual conta atualmente com apenas cerca de cinquenta animais puros, estando todos lotados na Estação Experimental da EPAGRI de Lages, em risco de extinção. Devido à importância para a biodiversidade e ao risco de perda deste recurso genético, justifica-se a necessidade e os esforços para a conservação genética da raça Flamenga, estando esta de acordo com a missão da Estação Experimental da EPAGRI em Lages.

As diferentes gerações de biotécnicas da reprodução animal, como a inseminação artificial (IA), a múltipla ovulação e transferência de embriões (TE), *ovum pick up* (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIV), a clonagem animal e transgenia, entre outras, sustentam a possibilidade de obtermos um aumento da produção, aliada à conservação e preservação de recursos genéticos (ANDRABI e MAXWELL, 2007; BERTOLINI e BERTOLINI, 2009; BETTERIDGE, 2003; WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000). Porém, para a multiplicação eficaz de bovinos em risco de extinção, há a necessidade da determinação do potencial das biotécnicas reprodutivas como ferramentas auxiliares. No entanto, informações científicas sobre a dinâmica folicular e a eficiência da OPU/PIV e da TE na raça Flamenga ainda são inexistentes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar as eficiências de produção *in vivo* (TE) e *in vitro* (OPU/PIV) de embriões em animais da raça Flamenga, avaliando-se o número de oócitos recuperados, o número de oócitos viáveis e a quantidade de embriões viáveis produzidos por OPU/PIV e por TE, comparando-se os resultados com animais da raça Holandesa.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os reagentes utilizados foram provenientes da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), salvo os que são indicados à parte.

### **3.2.1 Comitê de ética**

O projeto de pesquisa que embasa este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do estado de Santa Catarina (CAV/UDESC) no ano de 2010, com protocolo número 1.15.10.

### **3.2.2 Manejo nutricional dos animais**

Todos as animais utilizados no experimento estavam sob regime alimentar extensivo com pasto nativo e suplementação nutricional com ração à base de milho, soja, além de mineralização.

### **3.2.3 Local**

As etapas do Experimento envolvendo animais foram realizadas na Estação Experimental da EPAGRI de Lages (EEL), incluindo as atividades relacionadas às seções de OPU e de TE com fêmeas doadoras, a pesquisa e seleção dos oócitos oriundos de OPU, e procedimentos de superovulação e processos de coleta, pesquisa e seleção de embriões após a SOV. A manipulação dos ciclos reprodutivos de fêmeas receptoras selecionadas e a transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* também foram conduzidas na EEL. As etapas referentes à produção *in vitro* dos embriões, incluindo as etapas de maturação *in*

*in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem do CAV/UEDESC, em Lages, SC.

### 3.2.4 Animais

Foram utilizadas 16 fêmeas bovinas multíparas híbridas, sendo oito da raça Flamenga e oito da raça Holandesa, de propriedade da EPAGRI. Os animais utilizados foram caracterizados e selecionados quanto a condições zootécnicas, reprodutivas, produtivas e nutricionais para comporem grupos pareados divididos em dois grupos experimentais (A e B) em um delineamento em *split-plot*. Cada grupo foi composto de quatro animais de cada raça, distribuídos da forma mais homogênea possível em termos de idade, condição corporal, peso, número de lactações e dias em produção de leite (Tabela 1). Devido à raça Flamenga possuir poucos exemplares, o pareamento dos grupos transcorreu baseado na disponibilidade de animais no período que imediatamente antecedeu o início do experimento.

Tabela 1. Características zootécnicas, nutricionais e produtivas de fêmeas bovinas das raças Flamenga (n=8) e Holandesa (n=8) selecionadas como doadoras para a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos (média  $\pm$  d.p.)

Característica	Raça	
	Flamenga	Holandesa
Idade (anos)	8.1 $\pm$ 4.3	6.2 $\pm$ 2.1
Escore de condição corporal (1 a 5)	2.4 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.6
Peso (kg)	583.0 $\pm$ 117.5	588.5 $\pm$ 79.1
Número de lactações	2.8 $\pm$ 2.1	2.4 $\pm$ 1.3
Dias em leite	293.3 $\pm$ 85.0*	267.5 $\pm$ 94.1

\*Baseado em seis fêmeas em lactação

### **3.2.5 Grupos Experimentais**

Na primeira etapa do experimento (P1), as fêmeas do grupo A (quatro fêmeas de cada raça) foram submetidas a dez sessões consecutivas de OPU, na frequência de uma seção por semana. As estruturas obtidas foram então submetidas aos procedimentos de PIV de embriões, incluindo MIV, FIV e CIV. As fêmeas do grupo B (quatro de cada raça) foram submetidas a dois programas de TE, com intervalo de 63 dias. Os animais de ambos os grupos foram submetidos a um período de repouso de cinco dias antes da segunda etapa do experimento (P2), quando os tratamentos foram trocados entre os grupos de animais, com as fêmeas do grupo A sendo submetidas a duas seções de TE e os animais do grupo B a dez seções de OPU/PIV. Ao final do Experimento, cada animal de cada raça foi submetido a dez sessões de OPU e a duas sessões de TE, totalizando 80 aspirações foliculares e 16 TE por raça.

### **3.2.6 Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões**

Todas as doses de sêmen utilizadas para a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões foram oriundas da mesma partida de congelação de um ejaculado de um único touro da raça Flamengo, apresentando concentração final de  $30 \times 10^6$  espermatozóides por dose (500  $\mu$ L). O congelamento foi executado utilizando o meio Tris-gema (3,028g de Tris-hidroximetil-amino metano, 1,675g de ácido cítrico monohidratado, 0,2g de glicose, 20mL de gema de ovo em 100mL de água bi-destilada) e glicerol a 7%.



### 3.2.6.1 Produção *in vitro* de embriões (PIV)

#### (a) *Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “Ovum Pick Up” (OPU)*

As vacas utilizadas neste procedimento foram contidas em local apropriado, sendo em seguida executada a retirada das fezes do reto. Efetuou-se a limpeza da região perineal com água corrente. Para a anestesia epidural foram utilizados 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2%.

A aspiração *in vivo* dos oócitos foi realizada utilizando a metodologia descrita primeiramente por Pieterse *et al.* (1988) e adaptada por Seneda *et al.* (2003) com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia com transdutor linear de frequência de 6,0 MHz (Falcon 100, Pie Medical, Holanda) acoplado a uma guia transvaginal com tubulação de silicone de 5 mm para a aspiração folicular (WTA Ltda., Brasil). O dispositivo de aspiração folicular (guia transvaginal e transdutor linear) foi envolto por uma camisa sanitária e introduzido no canal vestibulo-vaginal até o fórnix cervical. Por manipulação retal, cada ovário foi posicionado junto à parede cranial da vagina, próximo ao transdutor. Para a punção foram utilizadas agulhas descartáveis 21 G (WTA Ltda., Brasil), sendo puncionados folículos com diâmetro mínimo de 3 mm, com uma pressão de vácuo correspondente à sucção de 10–20 mL/min de meio de coleta, exercida por uma bomba de infusão contínua hospitalar adaptada para esta finalidade (Nutrimat II<sup>®</sup>, B/Braun, São Gonçalo, Brasil). A agulha foi conectada à tubulação de silicone, que por sua vez foi conectada a um tubo cônico de 50 mL, contendo D-PBS suplementado com 25.000 UI/L de heparina sódica (Hepamax-S, Blausiegel, Cotia, Brasil). A mesma solução foi utilizada para lavar o sistema de coleta em intervalos regulares para evitar o entupimento do sistema por coágulos sanguíneos. Após a punção de cada par de ovários, o tubo de 50 mL contendo os oócitos foi encaminhado ao laboratório para a pesquisa, seleção e processamento dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) obtidos.

No laboratório, o conteúdo folicular foi filtrado em filtro de coleta de embriões, efetuando-se lavagem com meio de coleta à temperatura de 35 °C em quantidade suficiente para a remoção de debris teciduais, sangue e coágulos. Em seguida, o conteúdo residual foi depositado em placa de Petri de 100 mm para a pesquisa sob lupa estereomicroscópica. Os CCOs encontrados foram lavados sucessivamente, contados, avaliados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, II e IV, conforme Leibfried e First (1979), com os que apresentaram Graus de qualidade I, II e III sendo considerados viáveis.

Ovários bovinos obtidos em um abatedouro regional eram coletados em paralelo às sessões de OPU para serem utilizados como controle nos procedimentos de PIV de embriões, de acordo com Ribeiro *et al.* (2009).

(b) *Maturação in vitro (MIV)*

Os CCOs selecionados foram agrupados de acordo com a raça doadora e submetidos à MIV em grupos de 10 a 15 CCOs em gotas de 50 µL de meio MIV, sob óleo mineral, durante 22 a 24 h em incubadora a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa. O meio de maturação era composto por TCM199 com sais de Earle, suplementado com 26,2 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin, Bioniche, Animal Health, Canada), 5 µg/mL de LH (Lutropin, Bioniche, Animal Health, Canada) e 10% de Soro de Égua em Estro inativado (SEEI). As placas de MIV eram pré-estabilizadas em incubadora durante pelo menos 2 h.

(c) *Fecundação in vitro (FIV)*

Após a MIV, os CCOs foram co-incubados com 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, em gotas de 50 µL de meio Fert-TALP adicionado de 30 µg/mL de heparina sódica, 0,72 µg/mL

de penicilamina, 0,26 µg/mL de hipotaurina e 0,04 µg/mL de epinefrina (PARRISH *et al.*, 1988), sob óleo mineral. Para a segregação espermática e indução da capacitação espermática *in vitro*, os espermatozóides foram selecionados em gradiente descontínuo (45%/90%) de *Percoll*<sup>®</sup> (Nutricell, Campinas, SP) em microtubos de 1,5 mL, mediante centrifugação em mini centrífuga (MINI SPIN Eppendorf, Alemanha) a 13.100 RPM por 2 min. Desprezou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o *pellet* em meio Sperm-TALP (PARRISH *et al.*, 1988) por 45 s. Novamente se desprezou o sobrenadante, e uma amostra do novo *pellet* foi analisado quanto à motilidade total e ao vigor de motilidade espermática. Apenas amostras que possuíam um mínimo de 70% de motilidade foram utilizadas no experimento. A concentração espermática utilizada foi obtida através da contagem de células em câmara de Neubauer. A co-incubação dos CCOs e espermatozóides foi realizada por um período de 18 a 22 h, nas mesmas condições de incubação da MIV.

(d) *Cultivo in vitro (CIV)*

Ao final do período de FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos à remoção das células do *cumulus*, por pipetagens sucessivas, e em seguida as estruturas foram lavadas e transferidas para o meio de CIV, composto de SOFaaci (HOLM *et al.*, 1999), acrescido de 5% de SEEi. Os embriões foram cultivados em grupos de 10 a 15 em gotas de 50 µL sob óleo mineral, em incubadora a 39 °C, com atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub>, por 7 dias, em recipiente plástico hermeticamente fechado. A taxa de clivagem foi avaliada após 48 h de CIV. A taxa de blastocistos foi verificada no Dia 7 de desenvolvimento, considerando o dia da FIV como Dia 0. Os embriões PIV foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e a qualidade morfológica, de acordo com Stringfellow e Seidel (1998) e Ribeiro *et al.* (2009).

### 3.2.6.2 Produção *in vivo* de embriões

#### (a) *Protocolo de múltipla ovulação (SOV), inseminação artificial e coleta de embriões (TE)*

Para a produção *in vivo* de embriões, as fêmeas doadoras foram contidas e preparadas de forma semelhante à empregada para a aspiração folicular *in vivo*. Para o protocolo de SOV, as fêmeas foram submetidas ao tratamento hormonal e procedimentos técnicos, conforme abaixo:

- Dia 0: Colocação de dispositivo intravaginal impregnado com 1,55 g de progesterona (PRID<sup>®</sup>, Ceva Sante Animale, França) e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil) por via intramuscular (IM).
- Dia 4: Início da superovulação (SOV), com a administração de 20% da dose total (250, 300 ou 350 mg) de FSHp (Folltropin<sup>®</sup>-V, 400 mg, Bioniche Animal Health Inc., Canadá) às 7:00 h e 20% da dose às 19:00 h, por via IM.
- Dia 5: Administração de 15% da dose total de FSHp às 7:00 h e 15% às 19:00 h, por via IM.
- Dia 6: Administração de 10% da dose total de FSHp às 7:00 h e 10% da dose total de FSHp às 19:00 h, por via IM, concomitante à administração de 0,150 mg de *d*-cloprostenol (análogo da PGF<sub>2α</sub>, Prolise<sup>®</sup>, Arsa S.R.L., Argentina) e remoção do dispositivo vaginal de progesterona.
- Dia 7: Administração de 5% da dose total de FSHp às 7:00 h, concomitante à administração de 0,150 mg de *d*-cloprostenol e 5% da dose total de FSHp às 19:00 h, por via IM.
- Dia 8: Observação de estro das doadoras, com a inseminação artificial (IA) realizada 12 h após o início do estro.
- Dia 9: Observação de estro das doadoras, com a IA realizada 24 h após o início do estro.
- Dia 15: Coleta dos embriões por via cervical.

A dose total de FSH administrada durante o tratamento superovulatório foi definida tomando-se por base a idade e peso dos animais: oito animais de idade mais avançada (>7 anos) e/ou com maior peso (>550 kg) receberam uma dose de 350 mg; quatro fêmeas com peso (520 a 580 kg) e idade (5 a 7 anos) intermediários receberam uma dose de 300 mg; e

quatro fêmeas mais jovens (<5 anos) e com menor peso (480 a 520 kg) receberam a dose total de 250 mg de FSH.

(b) *Coleta, pesquisa, avaliação e armazenagem dos embriões*

No Dia 7 de desenvolvimento embrionário (15° dia do protocolo de TE, conforme acima), as fêmeas doadoras foram submetidas ao procedimento de coleta de embriões por via cervical, conforme Cruz *et al.* (2008). Para tanto, as fêmeas foram contidas em sequência aleatória em tronco de contenção adequado, onde foram avaliadas quanto à resposta superovulatória pela contagem estimada do número de corpos lúteos (CL) e folículos anovulatórios por ovário e por fêmea, por meio de palpação retal e ultrassonografia. Procedeu-se então a retirada das fezes do reto, a limpeza da região perineal com água corrente e antissepsia com álcool 70°GL, também sendo realizada a anestesia epidural com 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Anestésico L, Eurofarma, Brasil).

Para a coleta, foi utilizado um cateter de Foley no. 16 ou 18, com um mandril metálico adaptado em seu interior para conferir rigidez e permitir a introdução do instrumento no útero por via cervical. Após a passagem do cateter pela cérvix, posicionou-se a região do “balão” no corpo do útero, onde então o balão foi inflado com ar em volume de aproximadamente 5 a 20 cm<sup>3</sup>, até a adequada fixação do cateter ao órgão. Em seguida, procedeu-se a retirada do mandril e a conexão do cateter ao sistema de lavagem em sifão, com o meio de coleta sendo composto por uma solução de D-PBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Nutricell, Brasil) aquecida a 37°C.

Seguindo os procedimentos preconizados por Robertson e Nelson (1998), foram procedidas lavagens uterinas com volume suficiente para preencher os cornos uterinos tantas vezes quantas necessárias para o emprego de 1 L da solução de coleta. O líquido oriundo da

lavagem dos cornos uterinos foi recolhido em um filtro de coleta, com o excedente de fluido sendo filtrado. No final do procedimento de coleta, procedeu-se a recoleta uterina, conforme Cruz *et al.* (2008); para tanto, as fêmeas coletadas continuaram com o cateter posicionado no corpo do útero, sendo que os cornos uterinos permaneceram repletos de meio de coleta, sendo liberadas até o final das coletas, quando passaram novamente no tronco de contenção para a re-lavagem uterina com até 500 mL de meio de coleta.

No laboratório, o conteúdo de cada filtro de coleta ou recoleta foi depositado em placas de Petri de 100 mm com marcações quadriculadas no fundo para a pesquisa dos embriões sob lupa estereomicroscópica, sendo as estruturas lavadas e transferidas para uma placa de Petri de 35 mm contendo meio *TQC Holding plus* (Nutricell<sup>®</sup>, Brasil), onde os embriões foram classificados em viáveis e inviáveis, com os embriões viáveis sendo ainda classificados segundo a qualidade morfológica e o estágio de desenvolvimento embrionário, de acordo com Stringfellow e Seidel (1998).

### **3.2.7 Sincronização do ciclo estral de fêmeas receptoras de embriões e transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro***

Grupos de embriões da raça Flamenga em diferentes estádios de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) de diferentes graus de qualidade morfológica (I, II ou III) produzidos *in vivo* ou *in vitro* foram transferidos individualmente por via cervical para fêmeas receptoras com ciclos estrais sincronizados, de acordo com a disponibilidade, conforme protocolo de sincronização abaixo:

- Dia 0: Colocação de dispositivo intravaginal (PRID<sup>®</sup>, Ceva Sante Animale, França) e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil) por via IM.
- Dia 8: Retirada do inserto vaginal de progesterona, concomitante à administração de 0,150 mg de *d*-Cloprostenol (análogo da PGF<sub>2α</sub>, Prolise<sup>®</sup>, Arsa S.R.L., Argentina).

- Dias 9-11: Controle do estro, por meio de duas observações diárias de 45 a 60 min cada, a cada 12 h.
- Dia 17: Inovulação de um embrião por receptora na porção anterior do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL.

### **3.2.8 Criopreservação de embriões da raça Flamenga produzidos *in vivo* e *in vitro***

Embriões viáveis remanescentes da raça Flamenga (não transferidos) e todos os embriões provenientes de fêmeas da raça Holandesa foram submetidos à criopreservação pelo método convencional (embriões produzidos *in vivo* a partir de TE), de acordo com Voelkel e Hu (1992) utilizando 1,8 M (10%) de etileno glicol como agente crioprotetor, ou pelo processo de vitrificação (embriões produzidos *in vitro* a partir de OPU-PIV), segundo BUNN *et al.* (2005), sendo armazenados em botijão criogênico.

### **3.2.9 Diagnóstico e monitoramento das prenhez**

O diagnóstico de prenhez e o diagnóstico do gênero fetal (sexagem fetal) das receptoras foi realizado por ultrassonografia nos dias 30 e 60 de prenhez, respectivamente, sendo as prenhez monitoradas quinzenalmente por ultrassonografia até o final do primeiro trimestre de prenhez. Posteriormente, as receptoras foram monitoradas por palpação retal em intervalos mensais até o parto.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As variáveis quantitativas estudadas (número de CLs ou folículos, número de embriões viáveis e inviáveis, número de folículos aspirados, número de CCOs coletados) foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de Assimetria e Curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE, com as opções NORMAL e PLOT do SAS® (SAS Institute Inc., EUA, 2002). Variáveis que se encontraram fora da curva normal de distribuição foram submetidas a procedimentos de transformação. Os dados percentuais foram submetidos à transformação angular (arco-seno ( $\sqrt{X/100}$ )) e os dados não percentuais transformados logaritmicamente ( $\log(X+1)$ ) para aproximá-los da distribuição normal. Em seguida, as análises foram realizadas utilizando o PROC MIXED do pacote estatístico SAS (LITTELL *et al.*, 1998). Os dados quantitativos foram analisados em fatorial 2 x 2, por raça (Flamenga, Holandesa) e/ou por biotécnica reprodutiva (OPU/PIV, TE), com comparação pareada entre grupos pelo teste de Tukey. Os dados transformados que não se enquadraram na curva normal mesmo após a transformação foram considerados não-paramétricos (SAMPAIO, 2002). Desta forma, as variáveis não normalizadas foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Friedman (SAMPAIO, 2002), onde, inicialmente, foi realizado o ordenamento das observações por meio do PROC RANK do SAS e, em seguida, a análise dos ordenamentos pelo PROC MIXED. Adicionalmente, para avaliar a variação nas respostas às dez seções de OPU ou procedimentos de TE consecutivos ao longo do tempo, foi realizada uma avaliação individual para cada tratamento em cada tempo, utilizando o teste Duncan por meio do procedimento GLM do SAS. Os dados qualitativos relativos às taxas de clivagem e de blastocistos foram analisados pelo teste do  $\chi^2$ . A variação na distribuição quanto à morfologia embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica no dia 7 foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis (Minitab, EUA). As análises levaram em consideração um nível de significância de 5%.



### **3.4 RESULTADOS**

#### **3.4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

O resultado de 80 sessões de aspiração folicular (OPU) nos dois grupos de 8 animais por raça (Flamenga e Holandesa) e por período de aspiração (P1 e P2) estão sumarizados na Tabela 2. Os tempos de aspiração (total e efetivo) apresentaram pequenas variações, tanto entre raças quanto entre períodos experimentais. Números absolutos de folículos aspirados, oócitos recuperados e viáveis apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as duas raças em estudo, sendo maiores na raça Flamenga. Entretanto, esta diferença não ocorreu quando medimos as eficiências tanto de aspiração total quanto de CCOs viáveis. O total de CCOs viáveis recuperados foi a única variável que apresentou diferença significativa entre os períodos, sendo maior no P1. Ocorreu também diferença estatística entre os diferentes períodos experimentais dentro da raça Flamenga apenas em relação à eficiência de aspiração total, enquanto que na raça Holandesa o número de folículos aspirados, oócitos recuperados totais e viáveis, bem como a eficiência de aspiração, apresentaram diferença significativa.

Tabela 2. Eficiência da OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça e/ou por período de aspiração\*

Eficiência	Raça		Período		Flamenga		Holandesa	
	Flamenga	Holandesa	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Tempo médio de aspiração total/animal (min)	26.7 ± 0.8 <sup>B</sup>	28.1 ± 0.8 <sup>A</sup>	27.7 ± 1.0 <sup>α</sup>	27.1 ± 0.6 <sup>β</sup>	27.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	25.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	27.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	28.6 ± 0.8 <sup>a</sup>
Tempo médio de aspiração efetiva/animal (min)	15.7 ± 0.6 <sup>A</sup>	14.5 ± 0.6 <sup>A</sup>	15.6 ± 0.7 <sup>α</sup>	14.6 ± 0.4 <sup>β</sup>	16.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	14.8 ± 0.6 <sup>bc</sup>	14.6 ± 1.0 <sup>ab</sup>	14.3 ± 0.6 <sup>c</sup>
Total de folículos aspirados (n)	961 <sup>A</sup>	860 <sup>B</sup>	924 <sup>α</sup>	897 <sup>α</sup>	483 <sup>a</sup>	478 <sup>a</sup>	441 <sup>a</sup>	419 <sup>b</sup>
Total de oócitos recuperados (n)	718 <sup>A</sup>	609 <sup>B</sup>	670 <sup>α</sup>	657 <sup>α</sup>	342 <sup>ab</sup>	376 <sup>a</sup>	328 <sup>b</sup>	281 <sup>c</sup>
Eficiência de aspiração total (%)	74.7 <sup>A</sup>	70.8 <sup>A</sup>	72.5 <sup>α</sup>	73.2 <sup>α</sup>	70.8 <sup>bc</sup>	78.7 <sup>a</sup>	74.4 <sup>ab</sup>	67.1 <sup>c</sup>
Total de CCOs viáveis recuperados (n)	635 <sup>A</sup>	543 <sup>B</sup>	612 <sup>α</sup>	566 <sup>β</sup>	313 <sup>a</sup>	322 <sup>a</sup>	299 <sup>a</sup>	244 <sup>b</sup>
Eficiência de aspiração de CCOs viáveis (%)	66.1 <sup>A</sup>	63.1 <sup>A</sup>	66.2 <sup>α</sup>	63.1 <sup>α</sup>	64.8 <sup>a</sup>	67.4 <sup>a</sup>	67.8 <sup>a</sup>	58.2 <sup>b</sup>

\*Total de 80 sessões de OPU de cada raça, subdivididas em oito animais por raça em dois períodos diferentes

<sup>A,B</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>α,β</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para o período diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça em função do período diferem estatisticamente, para P<0.05.

A Tabela 3 sumariza a quantidade média de folículos ovarianos visualizados e aspirados nas duas raças e nos diferentes períodos experimentais, demonstrando também os tamanhos dos folículos e o lado dos ovários. Folículos pequenos foram aqueles que apresentaram de 3 a 6 mm; folículos médios apresentavam de 7 a 11 mm; e folículos grandes apresentavam acima de 12 mm de diâmetro. Não houve diferença estatística entre os diferentes tamanhos de folículos visualizados entre as raças. Contudo, quando foram comparados os períodos experimentais, ocorreram diferenças significativas nos totais de folículos visualizados. Além disso, pode ser observada certa prevalência de folículos pequenos quando relacionados com médios e grandes. Pode-se afirmar que houve diferença significativa nos totais de folículos aspirados entre raças e entre períodos, sendo o Período 1 e a Raça Flamengo os que apresentaram maior número de folículos aspirados.

Durante os dois períodos experimentais houve variações importantes tanto na média de folículos visualizados, quanto de folículos aspirados. Na Tabela 4 pode-se perceber que as fêmeas das raças Flamengo e Holandesa apresentaram diferenças estatísticas quanto às médias de folículos visualizados entre os diferentes períodos experimentais dentro da mesma raça, com valores significativamente maiores para o Período 1. Em relação aos folículos aspirados, houve diferença entre os períodos apenas na raça Holandesa, com valores significativamente maiores para o Período 2.

Tabela 3. Frequência média por animal (LSM  $\pm$  SEM) de folículos ovarianos visualizados e efetivamente aspirados por OPU em fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça ou por período de aspiração

Ovário	Folículos	Raça		Período		P <sub>raça</sub>	P <sub>período</sub>	
		Flamenga	Holandesa	P1	P2			
Esquerdo	Visualizados*	Pequenos	7.0 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	7.3 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	9.0 $\pm$ 0.4 <sup><math>\alpha</math></sup>	5.3 $\pm$ 0.4 <sup><math>\beta</math></sup>	0.2265	<0.0001
		Médios	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup><math>\beta</math></sup>	0.2219	0.0014
		Grandes	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.5294	0.0569
		Totais	7.5 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	8.1 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	9.6 $\pm$ 0.4 <sup><math>\alpha</math></sup>	6.0 $\pm$ 0.4 <sup><math>\beta</math></sup>	0.0926	<0.0001
	Aspirados totais <sup>†</sup>	6.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	5.8 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>	6.4 $\pm$ 0.3 <sup><math>\alpha</math></sup>	5.6 $\pm$ 0.2 <sup><math>\beta</math></sup>	0.7932	0.0777	
Direito	Visualizados*	Pequenos	6.9 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	6.5 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	8.0 $\pm$ 0.4 <sup><math>\alpha</math></sup>	5.3 $\pm$ 0.4 <sup><math>\beta</math></sup>	0.3315	<0.0001
		Médios	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.5 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.6034	0.2699
		Grandes	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup><math>\beta</math></sup>	0.5 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.5784	0.0021
		Totais	7.8 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	7.5 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	9.1 $\pm$ 0.4 <sup><math>\alpha</math></sup>	6.3 $\pm$ 0.4 <sup><math>\beta</math></sup>	0.4971	<0.0001
	Aspirados totais <sup>†</sup>	6.1 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	5.6 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>	6.1 $\pm$ 0.3 <sup><math>\alpha</math></sup>	5.6 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.0220	0.1752	
Esquerdo e Direito	Visualizados*	Pequenos	13.8 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	13.8 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	17.0 $\pm$ 0.7 <sup><math>\alpha</math></sup>	10.6 $\pm$ 0.7 <sup><math>\beta</math></sup>	0.8114	<0.0001
		Médios	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup><math>\beta</math></sup>	0.5362	0.0325
		Grandes	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup><math>\beta</math></sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup><math>\gamma\alpha</math></sup>	0.1315	<0.0001
		Totais	15.3 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	15.6 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	18.7 $\pm$ 0.7 <sup><math>\alpha</math></sup>	12.2 $\pm$ 0.7 <sup><math>\beta</math></sup>	0.5248	<0.0001
	Aspirados totais <sup>†</sup>	12.3 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	11.4 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	12.5 $\pm$ 0.5 <sup><math>\alpha</math></sup>	11.2 $\pm$ 0.4 <sup><math>\beta</math></sup>	<0.0001	0.0356	

\*Dados coletados em dez seções de OPU (seções 6 a 10) para todos os animais aspirados

<sup>†</sup>Dados coletados em 20 seções de OPU (seções 1 a 10) para todos os animais aspirados

<sup>A,B</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>$\alpha,\beta$</sup> : Números seguidos de letras desiguais na linha para o período diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 4. Frequência média por animal (LSM ± SEM) de folículos ovarianos visualizados e efetivamente aspirados por OPU em fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa por raça e período de aspiração

Ovário	Folículos	Flamenga		Holandesa		P <sub>raça*período</sub>	
		P1	P2	P1	P2		
Esquerdo	Visualizados*	Pequenos	8.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.6076
		Médios	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.2741
		Grandes	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7974
		Totais	9.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	9.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.9800
	Aspirados totais <sup>†</sup>	6.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>bc</sup>	5.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.1112	
Direito	Visualizados*	Pequenos	8.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	8.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.2628
		Médios	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.1692
		Grandes	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3605
		Totais	9.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	8.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.9430
	Aspirados totais <sup>†</sup>	6.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.2558	
Esquerdo e Direito	Visualizados*	Pequenos	16.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	11.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	17.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.0845
		Médios	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>ab</sup>	0.0447
		Grandes	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2062
		Totais	18.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	18.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.7722
	Aspirados totais <sup>†</sup>	12.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	10.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.0161	

\*Dados coletados em dez seções de OPU (seções 6 a 10) para todos os animais aspirados

†Dados coletados em 20 seções de OPU (seções 1 a 10) para todos os animais aspirados

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P<0.05.

Os CCOs recuperados durante o procedimento de OPU foram classificados quanto ao grau de qualidade conforme critérios definidos por Leibfried e First (1979) e estão apresentados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas entre as duas raças estudadas nos diferentes graus de qualidade oocitária, com exceção de oócitos Grau II, onde fêmeas da raça Flamengo apresentaram um número médio de estruturas maior em relação a fêmeas da raça Holandesa (Tabela 5). Quando comparamos os diferentes períodos experimentais, ocorreram diferenças significativas entre oócitos classificados como Graus II e III; entretanto, isto não se refletiu em diferença entre oócitos totais e viáveis. Quando analisados os dados por raça e período, pode-se observar que foram recuperados menos CCOs totais e viáveis no Período 2 para a Raça Flamengo.

Na Tabela 6 percebe-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as raças com relação ao percentual de oócitos Graus II e III, sendo que vacas da raça Flamengo apresentaram maior percentual de estruturas Grau II comparado com vacas da raça Holandesa, enquanto que estruturas Grau III tiveram um percentual menor em vacas da raça Flamengo. Neste mesmo sentido, oócitos classificados como Graus II e III apresentaram maior frequência de recuperação quando comparados com estruturas classificadas como Graus I e IV na raça Flamengo, enquanto que na raça Holandesa apenas o percentual de oócitos classificadas como Grau III foram superiores aos demais.

Tabela 5. Número médio de estruturas recuperadas por animal (LSM  $\pm$  SEM) após a OPU de fêmeas bovinas das raças Flamengo e Holandesa por raça e/ou por período de aspiração

CCO	Raça		Período		Flamenga		Holandesa		P <sub>raça*período</sub>
	Flamenga	Holandesa	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
Totais	9.2 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	8.2 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	9.0 $\pm$ 1.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	9.4 $\pm$ 0.7 <sup><math>\alpha</math></sup>	9.3 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	7.0 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	9.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.0850
Viáveis	8.0 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	7.3 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	8.0 $\pm$ 1.1 <sup><math>\alpha</math></sup>	8.1 $\pm$ 0.7 <sup><math>\alpha</math></sup>	8.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	8.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.0828
Grau I	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	0.4 $\pm$ 0.3 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.7 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.5803
Grau II	3.6 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	2.5 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	2.9 $\pm$ 0.8 <sup><math>\beta</math></sup>	4.4 $\pm$ 0.5 <sup><math>\alpha</math></sup>	2.3 $\pm$ 0.8 <sup>bc</sup>	2.7 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	2.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.0516
Grau III	3.8 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	4.1 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	4.7 $\pm$ 0.8 <sup><math>\alpha</math></sup>	3.0 $\pm$ 0.5 <sup><math>\beta</math></sup>	5.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.2923
Grau IV	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	1.0 $\pm$ 0.4 <sup><math>\alpha</math></sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.4905

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>$\alpha,\beta$ :</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha para o período diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha para cada raça em função do período diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 6. Número total de estruturas recuperadas por OPU e proporção de recuperação baseada na qualidade oocitária entre as raças bovinas Flamenga e Holandesa e entre os graus de qualidade oocitária conforme classificação morfológica

Qualidade oocitária	Raça			
	Flamenga		Holandesa	
	n	%	n	%
Grau I	54	7.5 <sup>aA</sup>	48	7.9 <sup>aA</sup>
Grau II	301	41.9 <sup>aB</sup>	202	33.1 <sup>bB</sup>
Grau III	280	39.0 <sup>aB</sup>	293	48.2 <sup>bC</sup>
Grau IV	83	13.1 <sup>aC</sup>	66	10.8 <sup>aA</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

Não houve diferença entre raças e/ou entre períodos com respeito ao número médio de folículos aspirados ou de CCOs recuperados por animal ao longo de dez seções de OPU, conforme ilustrado na Figura 1 e apresentado na Tabela 7, possivelmente pela existência de uma grande variação na resposta individual em cada grupo. Quando analisado o fator racial, independente do período de aspiração, fêmeas da raça Flamenga tiveram um maior número de folículos aspirados na seção 1 de OPU 1 do que fêmeas Holandesas nas seções 2, 3 e 9 de OPU, mas tal diferença não se refletiu no número de CCOs totais ou viáveis obtidos (Tabela 8). Quando se levou em consideração o efeito período, independente do fator racial (Tabela 9), o número de folículos aspirados na seção 1 de OPU no P2 foi superior aos folículos aspirados nas seções 8 e 10 do P2, não havendo diferença significativa entre as demais seções e dentro do P1. Não obstante, houve um número menor de CCOs totais e viáveis obtidos nas primeiras duas seções de OPU no P1 quando comparadas à quarta seção, para o mesmo período (P1), não havendo diferença entre as demais seções ou mesmo dentro do P2.



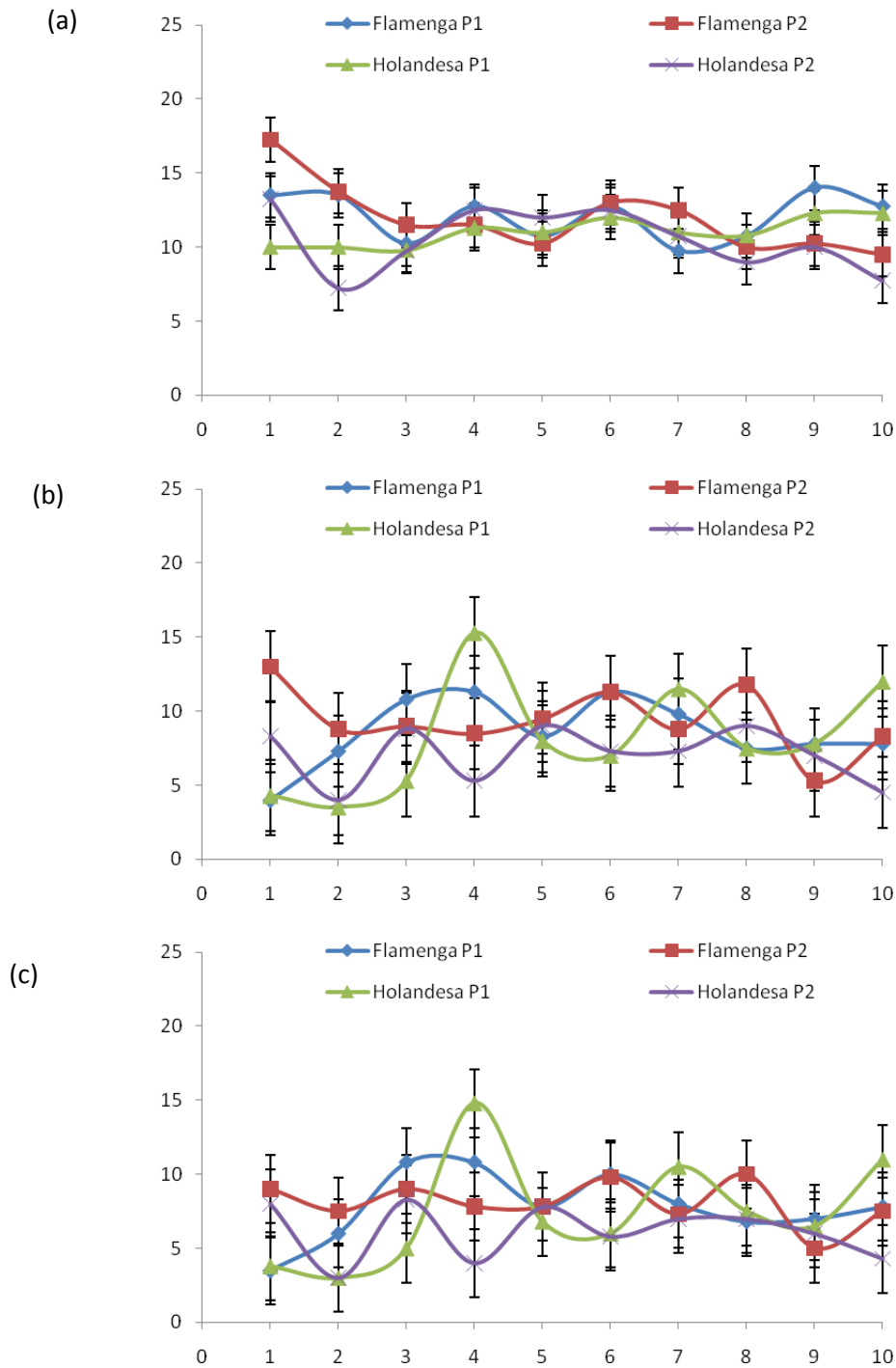


Figura 1. Número médio de folículos aspirados e CCOs recuperados por animal (LSM  $\pm$  SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamenga e Holandesa, por raça e por período de aspiração. (a) Folículos aspirados, (b) CCOs totais, e (c) CCOs viáveis. Para avaliação de comparações estatísticas, vide Tabela 7.

Tabela 7. Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM  $\pm$  SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamengo e Holandesa, por raça e por período de aspiração

Raça	Período	OPU	Folículos aspirados	CCOs	
				Totais	Viáveis
Flamenga	P1	1	13.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		2	13.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		3	10.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		4	12.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		5	10.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		6	12.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		7	9.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		8	10.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		9	14.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		10	12.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
	P2	1	17.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	13.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		2	13.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		3	11.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		4	11.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		5	10.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	9.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		6	13.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		7	12.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		8	10.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		9	10.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		10	9.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Holandesa	P1	1	10.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		2	10.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		3	9.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		4	11.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	15.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		5	11.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		6	12.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		7	11.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	11.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		8	10.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		9	12.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		10	12.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	12.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	11.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
	P2	1	13.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		2	7.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		3	9.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		4	12.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		5	12.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		6	12.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	5.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		7	10.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		8	9.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		9	10.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
		10	7.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	4.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 8. Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM  $\pm$  SEM) ao longo de dez seções de OPU de fêmeas bovinas das raças Flamengo e Holandesa, independente do período de aspiração

Raça	OPU	Folículos aspirados	CCOs	
			Totais	Viáveis
Flamenga	1	15.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	8.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	6.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	2	13.6 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	3	10.9 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	9.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	4	12.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	9.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	5	10.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	6	12.9 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	11.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	9.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	7	11.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	8	10.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	8.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	9	12.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	6.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	10	11.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Holandesa	1	11.6 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	6.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	2	8.6 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	3	9.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	4	11.9 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	10.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	5	11.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	6	12.3 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	7.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	7	10.9 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	8	9.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	9	11.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	7.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	6.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	10	10.0 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 9. Número médio de folículos aspirados e estruturas recuperadas por animal (LSM  $\pm$  SEM) ao longo de dez seções de OPU por período de aspiração, independente do fator racial

Período	OPU	Folículos aspirados	CCOs	
			Totais	Viáveis
P1	1	11.8 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	4.1 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	3.6 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>
	2	11.8 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	5.4 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	4.5 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>
	3	10.0 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.9 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	4	12.0 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	13.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
	5	10.9 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.1 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	6	12.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.1 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	7	10.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	10.6 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	9.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	8	10.8 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	7.5 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.1 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	9	13.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	6.8 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	10	12.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.9 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	9.4 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
P2	1	15.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	2	10.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	6.4 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	5.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	3	10.7 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	8.6 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	4	12.0 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	6.9 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	5.9 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	5	11.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.3 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	6	12.8 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	9.3 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	7	11.7 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	7.1 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	8	9.5 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	10.4 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	9	10.1 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	6.1 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	5.5 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>
	10	8.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	5.9 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

Foram submetidos à MIV e FIV um total de 608 CCOs oriundos de vacas da raça Flamengo, 514 de vacas da raça Holandesa e 641 provenientes de ovários de abatedouro (controle). Após o desnudamento, estruturas consideradas degeneradas pelo aspecto morfológico (grau IV) foram descartadas e não foram submetidas a CIV. A taxa de clivagem diferiu estatisticamente entre os três grupos, assim como a taxa de blastocistos baseada no número total de estruturas colocadas no CIV. Quando utilizamos como parâmetro a taxa de blastocistos baseada no número de embriões clivados, as duas raças em estudo apresentaram-se semelhantes (Tabela 10). As taxas de clivagem e blastocistos do grupo controle foram semelhantes às observadas na literatura e demonstram que o sistema de PIV utilizado no experimento foi adequado para sustentar o desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto, com diferenças estando relacionadas ao fator racial ou à técnica de obtenção e seleção de CCOs.

Tabela 10. Taxas de desenvolvimento embrionário a partir da FIV de COCs de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa utilizados para a PIV de embriões

Raça	CIV N	Clivagem		Blastocisto		
		n	%	n	% <sup>†</sup>	% <sup>‡</sup>
Flamenga	532	264	49.6 <sup>b</sup>	63	11.8 <sup>b</sup>	24.0 <sup>b</sup>
Holandesa	467	153	32.8 <sup>c</sup>	34	7.2 <sup>c</sup>	23.4 <sup>b</sup>
Controle	596	364	61.1 <sup>a</sup>	169	28.4 <sup>a</sup>	46.4 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>†</sup>Taxa de blastocistos baseada no número total de estruturas colocadas em CIV

<sup>‡</sup>Taxa de blastocistos baseada no número de embriões clivados

A taxa de clivagem dos embriões das vacas da raça Flamengo apresentou diferença estatística entre períodos. Porém, esta mesma variável não diferiu estatisticamente entre períodos na raça Holandesa (Tabela 11). As taxas de clivagem do 1º período experimental da raça Flamengo foram semelhantes às taxas de clivagem para a raça Holandesa nos dois

períodos experimentais. Não obstante, a taxa de clivagem do 2º período experimental da raça Flamengo foi superior as taxas de clivagem da raça Holandesa quando comparamos os dois períodos experimentais (Tabela 11).

Podemos observar na Tabela 11 que as taxas de blastocistos baseadas no total de estruturas cultivadas da raça Flamengo obtidas no 2º período experimental foram superiores àquelas encontradas no 1º período na mesma raça e nos dois períodos da raça Holandesa. Por outro lado, as taxas de blastocistos da raça Holandesa no 2º período experimental foram superiores à taxa de blastocisto do Período 1. Em adição, o número de blastocistos produzidos da raça Flamengo no Período 2 superaram em quantidade todos os blastocistos produzidos nos 2 períodos por fêmeas da raça Holandesa. Quando comparamos as taxas de blastocistos baseadas no número de embriões clivados, as duas raças foram estatisticamente semelhantes entre períodos, sendo que as taxas de blastocistos obtidas no Período 2 foram melhores que as obtidas no Período 1 para as duas raças em estudo. Este comportamento não foi observado no grupo controle, onde as taxas de blastocistos não diferiram entre períodos.

Tabela 11. Taxas de desenvolvimento embrionário de COCs de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa utilizados para a PIV de embriões, por período experimental

Raça	Período	CIV N	Clivagem		Blastocisto		
			n	%	n	% <sup>†</sup>	% <sup>‡</sup>
Flamenga	P1	278	108	38.8 <sup>c</sup>	18	6.5 <sup>cd</sup>	16.7 <sup>c</sup>
	P2	254	154	60.6 <sup>ab</sup>	45	17.7 <sup>b</sup>	29.2 <sup>b</sup>
Holandesa	P1	259	72	27.8 <sup>c</sup>	12	4.6 <sup>d</sup>	16.7 <sup>c</sup>
	P2	208	73	35.1 <sup>c</sup>	22	10.6 <sup>c</sup>	30.1 <sup>b</sup>
Controle	P1	299	168	56.2 <sup>b</sup>	79	26.4 <sup>a</sup>	47.0 <sup>a</sup>
	P2	196	297	66.0 <sup>a</sup>	90	30.3 <sup>a</sup>	45.9 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>†</sup>Taxa de blastocistos baseada no número total de estruturas colocadas em CIV

<sup>‡</sup>Taxa de blastocistos baseada no número de embriões clivados

P1>P2 em embriões grau I; sem diferença entre grupos em cada período ou em ambos períodos combinados na qualidade.

A maioria dos embriões produzidos aos 7 dias pós FIV das duas raças estudadas se concentraram nos estádios de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido (Figura 2). Nesta mesma figura, pode-se perceber que não houve diferença estatística entre as raças nos diferentes estádios de desenvolvimento embrionário. O número de blastocistos e blastocistos expandidos diferiram estatisticamente dos demais estádios nas duas raças, com exceção de blastocisto inicial na raça Flamengo (Figura 2). No 1º período experimental, foram produzidos mais blastocistos de estágio de desenvolvimento 4 a 6 (mórulas compactas, blastocistos iniciais e blastocistos) se comparados aos de estágio 7 a 9 (blastocistos expandidos, em eclosão e eclodidos) dentro da mesma raça. Contudo, este comportamento não foi observado no 2º período experimental (Figura 3).

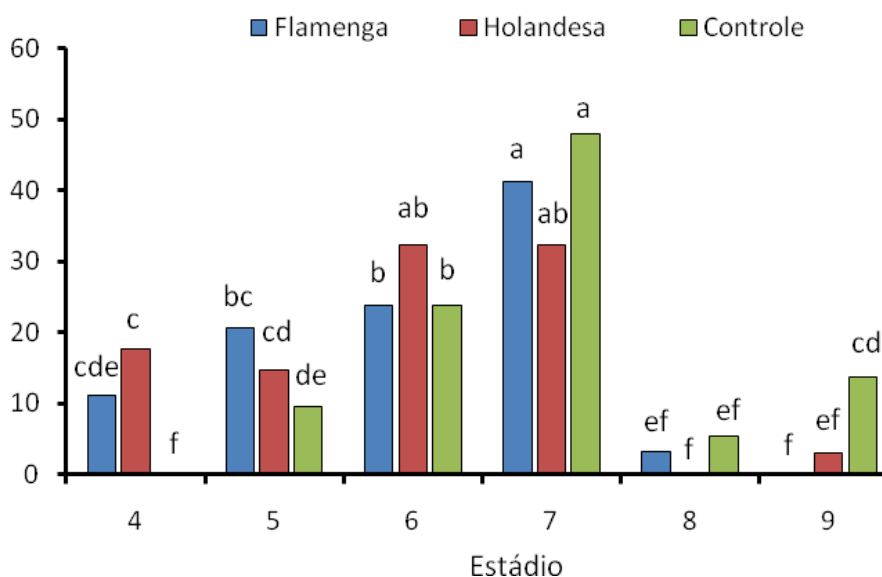


Figura 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Estádios 4: mórula compacta; 5: blastocisto inicial; 6: blastocisto; 7: blastocisto expandido; 8: blastocisto em eclosão; 9: blastocisto eclodido. <sup>a-f</sup>Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente,  $P < 0.05$ .

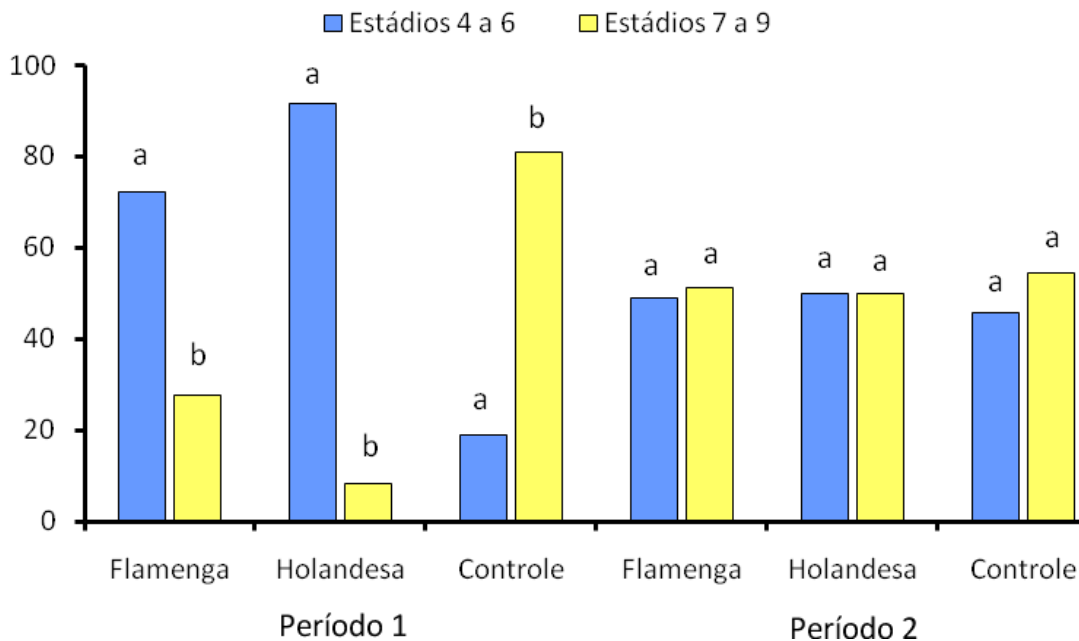


Figura 3. Taxa de desenvolvimento embrionário (%) por período experimental, após o agrupamento de estádios de desenvolvimento mais precoces e mais avançados, para embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamenga e Holandesa ou a partir de oócitos de ovários de abatedouro (Controle). Estádios 4 a 6: mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto; Estádios 7 a 9: blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. <sup>a,b</sup>Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente,  $P < 0.05$ .

Em relação à qualidade embrionária, ocorreu diferença significativa entre embriões de Graus I, II e III dentro da mesma raça. Porém, esta diferença não ocorreu entre as raças (Figura 4). O número de embriões Grau I superaram estatisticamente os de qualidade II, que subsequentemente superaram os classificados como Grau III (Figura 4).

Quando analisamos a proporção de embriões levando-se em consideração os dois períodos experimentais dentro de cada raça, as taxas de embrião de Graus I e II foram semelhantes entre si e superiores aos classificados como Grau III, com exceção dos obtidos de vacas da raça Holandesa no 1º período experimental, quando a proporção de embriões de Grau I foi maior que os de Grau II e III (Figura 5).

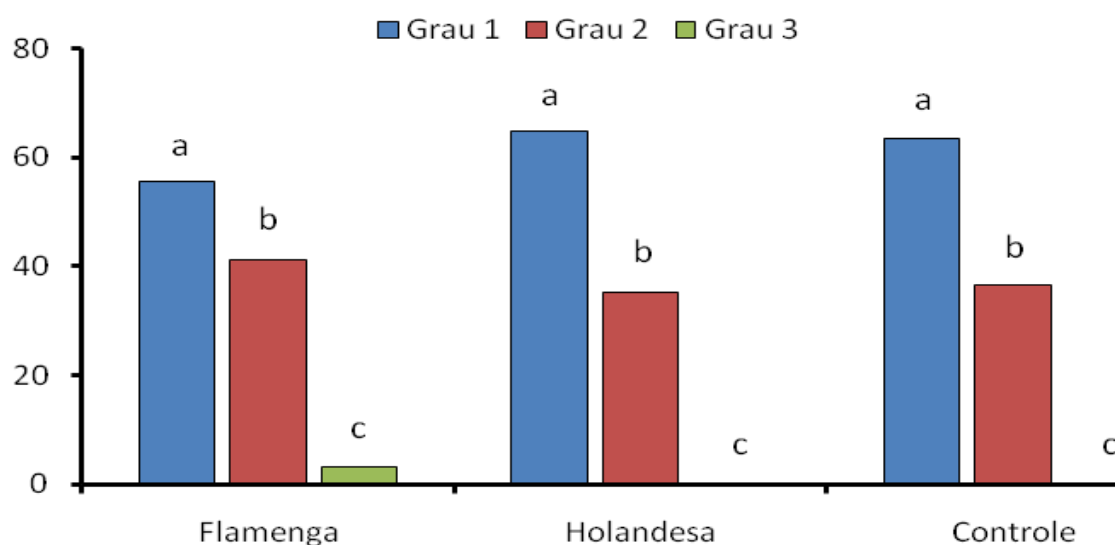


Figura 4. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de óocitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamenga e Holandesa ou a partir de óocitos de ovários de abatedouro (Controle). Qualidade morfológica - Grau I: excelente; Grau II: bom; Grau III: pobre. <sup>a-c</sup>:Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente, P<0.05.

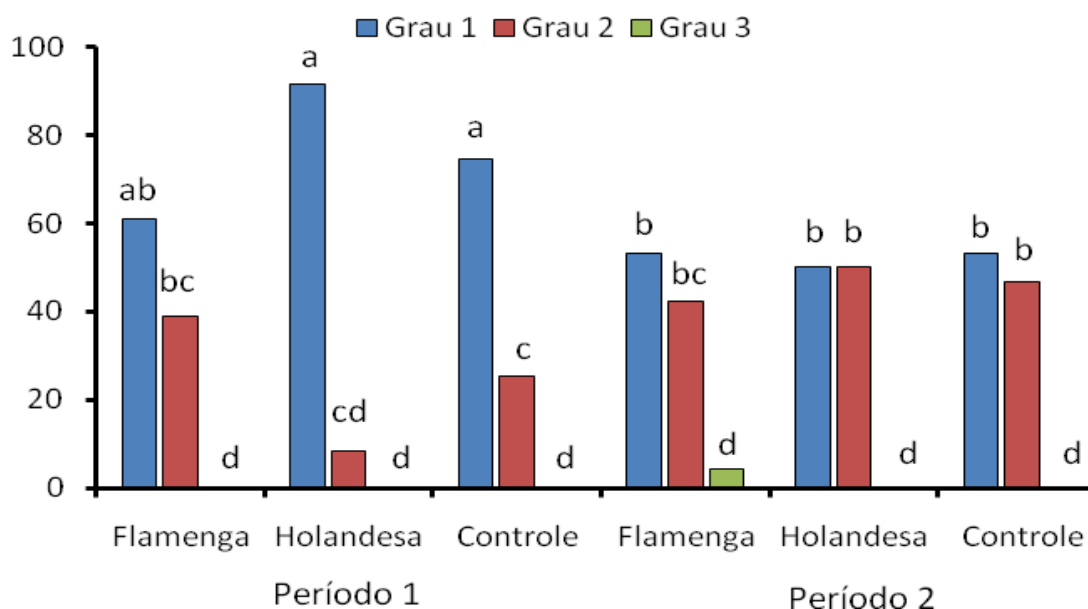


Figura 5. Taxa de desenvolvimento embrionário (%) por período experimental, com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de óocitos aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas das raças Flamenga e Holandesa ou a partir de óocitos de ovários de abatedouro (Controle). Qualidade morfológica - Grau I: excelente; Grau II: bom; Grau III: pobre. <sup>a-d</sup>:Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente, P<0.05.



### 3.4.2 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES

Concomitante ao procedimento de OPU/PIV ocorreram às coletas de embriões produzidos *in vivo* por TE, com os resultados sumarizados nas Tabelas 12 e 13.

Pode-se observar na Tabela 12 que existiu diferença estatística entre raças em favor da raça Flamengo quando comparamos o total de CLs, o total de embriões recuperados, a eficiência de recuperação total, o total de embriões viáveis recuperados e a eficiência de recuperação de embriões viáveis em relação à estimativa de CLs. Quando comparamos os períodos experimentais, independentemente das raças testadas, observou-se uma melhor eficiência de recuperação de embriões totais e viáveis no 1º período experimental (Tabela 12). Ao comparamos as duas raças e os dois períodos experimentais, observamos que fêmeas da raça Flamengo foram estatisticamente superiores às fêmeas Holandesas quanto ao total de estruturas recuperadas, à eficiência de recuperação total e ao total de embriões viáveis recuperados (Tabela 12).

As taxas de recuperação e o total de estruturas embrionárias produzidas *in vivo* recuperadas são apresentados na Tabela 13. Ocorreu diferença significativa dentro da mesma raça entre as variáveis estudadas, ou seja, embriões viáveis, estruturas degeneradas e estruturas não fecundadas, com a predominância de estruturas viáveis sobre as não viáveis. Porém, mesmo com um número elevado de estruturas a mais observado na raça Flamengo, não ocorreram diferenças estatísticas entre as duas raças em relação ao número de estruturas recuperadas.

Tabela 12. Eficiência da produção *in vivo* de embriões após a SOV de fêmeas bovinas das raças Flamengo e Holandesa, por raça e/ou por período\*

Eficiência	Raça		Período		Flamenga		Holandesa	
	Flamenga	Holandesa	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Estimativa do total de CLs (n)**	209 <sup>A</sup>	168 <sup>B</sup>	180 <sup>α</sup>	197 <sup>α</sup>	114 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	66 <sup>b</sup>	102 <sup>a</sup>
Total de estruturas recuperadas (n)	178 <sup>A</sup>	80 <sup>B</sup>	133 <sup>α</sup>	125 <sup>α</sup>	96 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	37 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>
Eficiência de recuperação total (%)	85.2 <sup>A</sup>	47.6 <sup>B</sup>	73.9 <sup>α</sup>	63.5 <sup>β</sup>	84.2 <sup>a</sup>	86.3 <sup>a</sup>	56.1 <sup>b</sup>	42.2 <sup>b</sup>
Total de embriões viáveis recuperados (n)	111 <sup>A</sup>	48 <sup>B</sup>	87 <sup>α</sup>	72 <sup>α</sup>	60 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>
Eficiência de recuperação de embriões viáveis (%) (em relação a estimativas de CLs)	53.1 <sup>A</sup>	28.6 <sup>B</sup>	48.3 <sup>α</sup>	36.5 <sup>β</sup>	52.6 <sup>a</sup>	53.7 <sup>a</sup>	41.0 <sup>a</sup>	20.6 <sup>b</sup>
Eficiência de recuperação de embriões viáveis (%)(em relação ao total de estruturas recuperadas)	62.4 <sup>A</sup>	60.0 <sup>A</sup>	65.4 <sup>α</sup>	57.6 <sup>α</sup>	62.5 <sup>ab</sup>	62.2 <sup>ab</sup>	73.0 <sup>a</sup>	48.8 <sup>b</sup>

\*No total de quatro seções de SOV, dois grupos de quatro fêmeas de cada raça foram submetidos a duas seções consecutivas por animal com intervalo de 60 dias

<sup>A,B</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>α,β</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para o período diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha para a raça em função do período diferem estatisticamente, para P<0.05.

\*\*Na contagem da estimativa de CLs, os ovários que apresentavam um número de estruturas incontáveis foram contabilizados dez CLs.

Tabela 13. Taxas de recuperação de estruturas embrionárias após duas lavagens uterinas em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa submetidas a TE

Raça	Estruturas recuperadas						
	Viáveis		Degeneradas		Não-fecundadas		Total
	N	%	n	%	n	%	n
Flamenga	111	62.2 <sup>aA</sup>	47	27.3 <sup>aB</sup>	20	11.2 <sup>aC</sup>	178
Holandesa	48	60.0 <sup>aA</sup>	25	31.3 <sup>aB</sup>	7	8.7 <sup>aC</sup>	80
Flamenga + Holandesa	159	61.9 <sup>A</sup>	71	27.6 <sup>B</sup>	27	10.5 <sup>C</sup>	257

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P<0.05.

Na Tabela 14, podemos observar as taxas e o total de estruturas embrionárias recuperadas após procedimentos de coleta e recoleta de fêmeas das raças Flamengo e Holandesa submetidas à TE. Pode-se perceber neste contexto que fêmeas da raça Flamengo apresentaram um número maior de estruturas viáveis quando comparadas a fêmeas Holandesas no procedimento de coleta. Outra diferença apresentada foi quando comparamos as duas técnicas, onde a coleta superou a recoleta de estruturas viáveis para a raça Flamengo, o que não foi observado na raça Holandesa. Esta diferença estatística também esteve presente quando tomamos por base a soma de estruturas viáveis das duas raças. Para estruturas degeneradas, ocorreram diferenças entre coleta e recoleta dentro das raças. Não houve diferença significativa entre os procedimentos de coleta e recoleta em relação a estruturas não fecundadas.

Ocorreram diferenças estatísticas relevantes quando comparamos estruturas viáveis com degeneradas e não fecundadas no processo de coleta na raça Flamengo e na recoleta na raça Holandesa. Nos procedimentos de recoleta de fêmeas da raça Flamengo e coleta de fêmeas da raça Holandesa ocorreram diferenças significativas apenas quando comparamos estruturas não fecundadas com as outras duas variáveis. Da mesma forma, não ocorreram diferenças significativas entre raças, entre períodos e entre SOVs em relação às médias de estruturas viáveis, degeneradas e não fecundadas. Contudo, podemos perceber certas diferenças estatísticas quando comparamos embriões viáveis, estruturas degeneradas e não fecundadas dentro da mesma raça e dentro dos mesmos períodos experimentais, onde na grande maioria das vezes, o número de embriões viáveis superou o número de estruturas degeneradas e não fecundadas (Tabela 15 e 16).

Tabela 14. Taxas de recuperação de estruturas embrionárias no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina primária (coleta) e secundária (recoleta) de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas

Raça	Procedimento	Estruturas recuperadas							
		Viáveis		Degeneradas		Não-fecundadas		Total	
		N	%	n	%	n	%	n	%
Flamenga	Coleta	88	79.3 <sup>aA</sup>	28	59.6 <sup>Ab</sup>	10	50.0 <sup>aB</sup>	126	70.8 <sup>a</sup>
	Recoleta	23	20.7 <sup>cA</sup>	19	40.4 <sup>bA</sup>	10	50.0 <sup>aB</sup>	52	29.2 <sup>b</sup>
Holandesa	Coleta	25	52.1 <sup>bA</sup>	18	72.0 <sup>aA</sup>	4	57.1 <sup>aB</sup>	47	58.8 <sup>a</sup>
	Recoleta	23	47.9 <sup>bA</sup>	7	28.0 <sup>cA</sup>	3	42.9 <sup>aB</sup>	33	41.2 <sup>a</sup>
Flamenga + Holandesa	Coleta	113	71.1 <sup>aA</sup>	46	64.8 <sup>aB</sup>	14	51.9 <sup>aC</sup>	173	67.3 <sup>a</sup>
	Recoleta	46	28.9 <sup>cA</sup>	25	35.2 <sup>bB</sup>	13	47.1 <sup>aB</sup>	84	32.7 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 15. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas para a raça, período e seqüência de TE

Raça	Período	TE	Estruturas recuperadas										
			Viáveis			Degeneradas			Não-fecundadas			Total	
			Média*	n	%	Média*	n	%	Média*	n	%	Média*	n
Flamenga	P1	1	8.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	26	59.1 <sup>bA</sup>	3.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	9	20.5 <sup>cB</sup>	3.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	9	20.5 <sup>aB</sup>	14.7 ± 5.6 <sup>a</sup>	44
		2	8.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	34	65.4 <sup>bA</sup>	2.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	11	21.2 <sup>cB</sup>	1.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	7	13.5 <sup>aB</sup>	13.0 ± 4.9 <sup>a</sup>	52
	P2	1	4.8 ± 4.3 <sup>a</sup>	19	59.4 <sup>bA</sup>	2.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	11	34.4 <sup>bcA</sup>	0.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	2	6.3 <sup>abB</sup>	8.0 ± 4.9 <sup>a</sup>	32
		2	8.0 ± 4.3 <sup>a</sup>	32	64.0 <sup>bA</sup>	4.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	16	32.0 <sup>bcB</sup>	0.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	2	4.0 <sup>bcC</sup>	12.5 ± 4.9 <sup>a</sup>	50
Holandesa	P1	1	8.3 ± 4.9 <sup>a</sup>	25	89.3 <sup>aA</sup>	0.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>dB</sup>	1.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	3	10.7 <sup>abB</sup>	9.3 ± 5.6 <sup>a</sup>	28
		2	0.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	2	22.2 <sup>cB</sup>	1.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	7	77.8 <sup>aA</sup>	0.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cB</sup>	2.3 ± 4.9 <sup>a</sup>	9
	P2	1	2.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	8	50.0 <sup>bcA</sup>	2.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	8	50.0 <sup>abA</sup>	0.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cB</sup>	5.3 ± 5.6 <sup>a</sup>	16
		2	3.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	13	48.1 <sup>bcA</sup>	2.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	10	37.0 <sup>acA</sup>	1.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	4	14.8 <sup>aB</sup>	6.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	27

\*Média de estruturas recuperadas por doadora (LSM ± SEM)

a,b,c,d: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

A,B,C: Números seguidos de letras desiguais na linha, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 16. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação após a lavagem uterina de fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se o fator raça, período ou seqüência de TE

Aspecto		Estruturas recuperadas										
		Viáveis			Degeneradas			Não-fecundadas			Total	
		Média*	N	%	Média*	n	%	Média*	n	%	Média*	n
Raça	Fla	7.5 ± 2.2 <sup>α</sup>	111	62.4 <sup>Aa</sup>	3.1 ± 0.6 <sup>α</sup>	47	26.4 <sup>abB</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>α</sup>	20	11.2 <sup>abC</sup>	12.0 ± 2.5 <sup>α</sup>	126
	Hol	3.7 ± 2.3 <sup>α</sup>	48	60.0 <sup>aA</sup>	1.7 ± 0.6 <sup>α</sup>	25	31.3 <sup>abA</sup>	0.5 ± 0.6 <sup>α</sup>	7	8.8 <sup>abC</sup>	5.9 ± 2.6 <sup>α</sup>	47
Período	P1	6.5 ± 2.3 <sup>α</sup>	87	65.4 <sup>aA</sup>	1.9 ± 0.6 <sup>α</sup>	27	20.3 <sup>bB</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>α</sup>	19	14.3 <sup>aB</sup>	9.8 ± 2.6 <sup>α</sup>	98
	P2	4.7 ± 2.2 <sup>α</sup>	72	57.6 <sup>aA</sup>	3.0 ± 0.6 <sup>α</sup>	45	36.0 <sup>aB</sup>	0.5 ± 0.6 <sup>α</sup>	8	6.4 <sup>bC</sup>	8.1 ± 2.5 <sup>α</sup>	75
TE	1	6.1 ± 2.4 <sup>α</sup>	78	65.0 <sup>aA</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>α</sup>	28	23.3 <sup>abB</sup>	1.1 ± 0.7 <sup>α</sup>	14	11.7 <sup>abC</sup>	9.3 ± 2.7 <sup>α</sup>	85
	2	5.1 ± 2.1 <sup>α</sup>	81	58.7 <sup>aA</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>α</sup>	44	31.9 <sup>abB</sup>	0.8 ± 0.6 <sup>α</sup>	13	9.4 <sup>abC</sup>	8.6 ± 2.4 <sup>α</sup>	88

\*Média de estruturas recuperadas por doadora (LSM ± SEM)

<sup>α,β</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna, para comparações entre raça, período e TE, diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05

Os diferentes graus de qualidade dos embriões recuperados durante o experimento são apresentados nas Tabelas 17 e 18. Não foram observadas diferenças nos diferentes graus de qualidade quando as variáveis raça, período e TE foram analisadas separadamente (Tabela 17). Entretanto, quando uma destas variáveis é agrupada, observou-se diferença significativa dentro de cada categoria de qualidade embrionária (Tabela 18), onde fêmeas da raça Flamengo produziram mais embriões de Grau I e III do que fêmeas da raça Holandesa. Além disso, variações entre os diferentes graus de qualidade foram observadas, onde na maioria das vezes os embriões de Grau I recuperados superaram os classificados como Grau II e Grau III, independente de raça, período e TE.

Na Tabela 19 são apresentadas as quantidades e as percentagens de estruturas viáveis (mórulas compactas e blastocistos) recuperados em todas as sessões de TE do experimento. Podemos observar que, salvo algumas exceções, o estágio de mórula compacta superou em valores absolutos o número de blastocistos obtidos no experimento. Além deste dado, é importante ressaltar que fêmeas da raça Flamengo produziram mais que o dobro de estruturas viáveis produzidas *in vivo* que fêmeas da raça Holandesa (111 vs. 48, respectivamente).



Tabela 17. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se a raça, o período e a sequência de TE

Raça	Período	TE	Qualidade embrionária								
			Grau I			Grau II			Grau III		
			Média*	n	%	Média*	n	%	Média*	n	%
Flamenga	P1	1	6.3 ± 3.0 <sup>a</sup>	19	43.2 <sup>Ba</sup>	2.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	7	15.9 <sup>abB</sup>	0.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cC</sup>
		2	2.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	8	15.4 <sup>cA</sup>	2.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	11	21.2 <sup>abA</sup>	3.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	15	28.8 <sup>aA</sup>
	P2	1	0.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	2	6.3 <sup>cB</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	9	28.1 <sup>abA</sup>	2.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	8	25.0 <sup>abA</sup>
		2	4.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	19	38.0 <sup>bA</sup>	1.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	7	14.0 <sup>abB</sup>	1.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	6	12.0 <sup>bB</sup>
Holandesa	P1	1	7.3 ± 3.0 <sup>a</sup>	22	78.6 <sup>aA</sup>	1.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	3	10.7 <sup>bB</sup>	0.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cB</sup>
		2	0.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cA</sup>	0.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	2	22.2 <sup>abA</sup>	0.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>bA</sup>
	P2	1	0.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cB</sup>	1.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	4	25.0 <sup>abA</sup>	1.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	4	25.0 <sup>abA</sup>
		2	0.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>cB</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	9	33.3 <sup>Aa</sup>	1.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	4	14.8 <sup>abAB</sup>

\*Média de estruturas recuperadas por doadora (LSM ± SEM)

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha, para cada raça, diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 18. Número de estruturas embrionárias recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas, considerando-se o fator raça, período e TE individualmente

Aspecto		Qualidade embrionária								
		Grau I			Grau II			Grau III		
		Média*	n	%	Média*	N	%	Média*	n	%
Raça	Fla	3.4 ± 1.4 <sup>α</sup>	48	27.0 <sup>abA</sup>	2.3 ± 0.7 <sup>α</sup>	34	19.1 <sup>aAB</sup>	1.8 ± 0.8 <sup>α</sup>	29	16.3 <sup>abB</sup>
	Hol	1.8 ± 1.4 <sup>β</sup>	22	27.5 <sup>abA</sup>	1.3 ± 0.7 <sup>α</sup>	18	22.5 <sup>aA</sup>	0.6 ± 0.9 <sup>β</sup>	8	10.0 <sup>abB</sup>
Período	P1	3.9 ± 1.4 <sup>α</sup>	49	36.8 <sup>aA</sup>	1.6 ± 0.7 <sup>α</sup>	23	17.3 <sup>aB</sup>	0.9 ± 0.9 <sup>β</sup>	15	11.3 <sup>abB</sup>
	P2	1.3 ± 1.4 <sup>β</sup>	21	16.8 <sup>ba</sup>	1.9 ± 0.7 <sup>α</sup>	29	23.2 <sup>aA</sup>	1.5 ± 0.8 <sup>α</sup>	22	17.6 <sup>aA</sup>
TE	1	3.5 ± 1.5 <sup>α</sup>	43	35.8 <sup>aA</sup>	1.7 ± 0.7 <sup>α</sup>	23	19.2 <sup>aB</sup>	0.8 ± 0.9 <sup>β</sup>	12	10.0 <sup>aC</sup>
	2	1.7 ± 1.3 <sup>β</sup>	27	19.6 <sup>ba</sup>	1.8 ± 0.6 <sup>α</sup>	29	21.0 <sup>aA</sup>	1.6 ± 0.8 <sup>α</sup>	25	18.1 <sup>aA</sup>

\*Média de estruturas recuperadas por doadora (LSM ± SEM)

<sup>α,β</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna, para comparações entre raça, período e TE, diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>a,b,c</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B,C</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P<0.05.

Tabela 19. Número de estruturas embrionárias viáveis (mórulas compactas e todos os estádios de blastocistos) recuperadas no Dia 7 pós-inseminação, de acordo com a qualidade morfológica embrionária após a lavagem uterina em fêmeas bovinas da raça Flamengo e Holandesa superovuladas

Raça	Período	TE	Mórula Compacta		Blastocistos		TOTAL
			n	%	n	%	n
Flamenga	P1	1	25	96.2 <sup>aA</sup>	1	3.8 <sup>aB</sup>	26
		2	32	94.1 <sup>aA</sup>	2	5.9 <sup>aB</sup>	34
	P2	1	17	89.5 <sup>aA</sup>	2	10.5 <sup>bB</sup>	19
		2	7	21.9 <sup>bB</sup>	25	78.1 <sup>aA</sup>	32
Holandesa	P1	1	25	100.0 <sup>a</sup>	0	0.0	25
		2	2	100.0 <sup>b</sup>	0	0.0	2
	P2	1	8	100.0 <sup>b</sup>	0	0.0 <sup>b</sup>	8
		2	8	61.5 <sup>bA</sup>	5	38.5 <sup>aB</sup>	13
Flamenga	P1		57	95.0 <sup>aA</sup>	3	5.0 <sup>bB</sup>	60
	P2	1+2	24	47.1 <sup>bA</sup>	27	52.9 <sup>aA</sup>	51
Holandesa	P1		27	100.0 <sup>b</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	27
	P2		16	76.2 <sup>bcA</sup>	5	23.8 <sup>bB</sup>	21
Flamenga	P1+P2	1	42	93.3 <sup>aA</sup>	3	6.7 <sup>bB</sup>	45
		2	39	59.1 <sup>aA</sup>	27	40.9 <sup>aB</sup>	66
Holandesa		1	33	100.0 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	33
		2	10	66.7 <sup>bA</sup>	5	33.3 <sup>bB</sup>	15
Flamenga	1+2	1+2	81	73.0 <sup>aA</sup>	30	27.0 <sup>aB</sup>	111
Holandesa			43	89.6 <sup>bA</sup>	5	10.4 <sup>bB</sup>	48
Flamenga + Holandesa	1	1+2	84	96.6 <sup>aA</sup>	3	3.4 <sup>bB</sup>	87
			40	55.6 <sup>bA</sup>	32	44.4 <sup>aA</sup>	72
Flamenga + Holandesa	1+2	1	75	96.2 <sup>aA</sup>	3	3.8 <sup>bB</sup>	78
		2	49	49.4 <sup>bA</sup>	32	50.6 <sup>aA</sup>	81

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente, para P<0.05.

<sup>A,B</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P<0.05.

### 3.4.3 PRODUÇÃO *IN VIVO* VS *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Durante a fase experimental, que ocupou um período de 21 semanas, foram produzidos *in vivo* um total de 111 embriões viáveis da raça Flamengo e 48 da raça Holandesa, com uma média de 7,5 estruturas viáveis por doadoras da raça Flamengo e 3,7 da raça Holandesa. Da produção *in vitro* de embriões, foram obtidos 63 estruturas viáveis de fêmeas da raça Flamengo, com uma média de 3,9 embriões viáveis por doadora, e 34 embriões da raça Holandesa, em uma média de 2,1 estruturas viáveis produzidas por fêmea em todo o período experimental (Tabela 20). A raça Flamengo superou a raça Holandesa em número de embriões viáveis produzidos *in vivo* (111 vs. 48, respectivamente), sendo que diferença semelhante também pôde ser observada proporcionalmente na produção *in vitro* de embriões (63 vs. 34, respectivamente), o que representa na raça Holandesa uma produção de 43% e 54% dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* na raça Flamengo, respectivamente. Observando-se a Tabela 20, pode-se perceber que fêmeas da raça Flamengo geraram até o dobro do número de embriões viáveis comparadas às fêmeas da raça Holandesa, para cada procedimento. Além disso, podemos observar na mesma tabela que, dentro das condições experimentais deste estudo, os procedimentos de TE produziram cerca do dobro de embriões viáveis que a OPU-PIV, dentro de cada raça.

Tabela 20. Comparação entre estruturas ovarianas, estruturas recuperadas e produção *in vivo* e *in vitro* de estruturas embrionárias viáveis em fêmeas da raça Flamengo e Holandesa de acordo com o sistema de produção de embriões

Raça	Sistema de produção de embriões	Estruturas ovarianas*		Estruturas recuperadas†		Embriões viáveis (Dia 7)‡				
		N	Média por doadora		n	Média por doadora		n	Média por doadora	
			Por período	Por seção		Por período	Por seção		Por período	Por seção
Flamenga	OPU-PIV	961	120.1	12.34	718	89.8	9.2	63	7.9	3.9
	TE	209	29.9	7.5	178	25.4	12.0	111	15.9	7.5
Holandesa	OPU-PIV	860	107.5	11.4	609	76.1	8.2	34	4.3	2.1
	TE	168	28.0	7.0	80	13.3	5.9	48	8.0	3.7

\*Estruturas ovarianas: número de folículos aspirados pela OPU-PIV ou estimativa do número de CLs no Dia 7 pela TE

†Estruturas recuperadas: número de complexos cúmulus-oócito recuperados pela OPU-PIV ou de estruturas recuperadas pela lavagem uterina no Dia 7 pela TE

‡Embriões viáveis: número de blastocistos obtidos no Dia 7 de CIV pela OPU-PIV ou de embriões viáveis (mórulas compactas e blastocistos) no Dia 7 pela TE

#### **3.4.4 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, PRENHEZES E BANCO DE EMBRIÕES**

No período que compreendeu o experimento (janeiro a junho de 2010), foi executado um total de 47 transferências de embriões, sendo 24 transferências de embriões produzidos por TE (14 a fresco e 10 congelados), e 23 transferências de blastocistos produzidos por OPU/FIV (18 a fresco e 5 vitrificados). Somente foram transferidos embriões da raça Flamengo.

Dos 14 embriões produzidos por TE e transferidos a fresco, quatro receptoras engravidaram (28,6%), com todas fêmeas chegando a termo. Já das 10 transferências de embriões TE congelados, 3 receptoras engravidaram (30%). Porém, uma fêmea abortou no 62º dia de prenhez.

Das 18 transferências provenientes de embriões de OPU-PIV a fresco, foram obtidas seis prenhez (33,3%), com dois abortos, uma aos 45 dias e outra com 6 meses de prenhez. Não foi obtida nenhuma prenhez das cinco transferências de blastocistos PIV vitrificados.

Um banco de embriões criopreservados em N<sub>2</sub>L contendo um total de 87 embriões provenientes da TE, congelados pelo método convencional, e 40 blastocistos vitrificados de OPU-PIV, todos da raça Flamengo, encontra-se à disposição para transferências. Em adição, todos os embriões produzidos por TE ou OPU-PIV (n=82) da cruzada Flamengo (touro) vs. Holandesa (fêmeas) permanecem criopreservados em N<sub>2</sub>L, também fazendo parte do banco de embriões da EPAGRI de Lages.

Tabela 21. Transferências, prenhez, nascimentos e banco de germoplasma da raça Flamengo conforme o processo de produção de embriões

Raça	Sistema de produção de embriões	Tipo	Transferências		Prenhez		Nascimentos		Banco de germoplasma
			n		n	%	n	%	n
Flamenga	TE	Fresco	14		4	28.6	4	100	-
		Congelado	10		3	30	2	66.6	87
	PIV	Fresco	18		6	33.3	4	66.6	-
		Vitrificado	5		0	0	0	0	40

### 3.5 DISCUSSÃO

#### 3.5.1 EFICIÊNCIA DA OPU-PIV EM FÊMEAS DAS RAÇAS FLAMENGA E HOLANDESA

Em recente estudo, Aller *et al.* (2010), utilizando vacas da raça angus, sem qualquer tratamento hormonal, visualizaram ao ultrassom uma média de 8,4 folículos/vaca/sessão, sendo esta média relativamente menor do que aquelas encontradas em nosso experimento, onde foram visualizados em média 15,3 e 15,6 folículos/vaca/sessão nas raças Flamengo e Holandesa, respectivamente. Da mesma forma, o número médio de folículos aspirados/vaca/sessão para fêmeas da raça Flamengo (n = 12,3) e Holandesa (n = 11,4) foram superiores aos obtidos por Chaubal *et al.* (2006) em fêmeas cruzadas Angus (n = 7,8).

Neste experimento, a média de folículos aspirados por OPU diferiu significativamente entre as raças em estudo, com a raça Flamengo apresentando um número maior de folículos aspiráveis do que as fêmeas Holandesas, mesmo que a média do número de folículos visualizados entre as raças tenha sido semelhante. Apesar disto, pode-se observar a existência de uma associação positiva entre o número de folículos visualizados e o número de folículos aspirados, o que corrobora com as mesmas observações realizadas por Bols *et al.* (2004) e Aller *et al.* (2010). Porém, não ficou evidente se de fato fêmeas da raça Flamengo apresentam uma população folicular maior ou mesmo se mais folículos são recrutados por onda de desenvolvimento folicular, quando comparadas às Holandesas. Além disso, o perfil de dinâmica folicular das fêmeas da raça Flamengo era desconhecido, ou seja, desconhece-se a proporção na raça de fêmeas com uma, duas, três ou mesmo quatro ondas foliculares por ciclo, o que pode influenciar dramaticamente a eficiência na aspiração folicular por OPU, pois quanto maior o número de ondas, maior a probabilidade de encontrarmos um maior número de folículos aspiráveis de tamanhos menores (PONTES *et al.*, 2009). Ainda permanece, então,



a necessidade da execução de estudos futuros que visem à caracterização da dinâmica folicular em fêmeas da raça Flamenga. Para as duas raças em estudo neste experimento, em torno de 90,0% dos folículos aspirados eram de tamanho pequeno, 7,0% de tamanho médio e 3,0% de tamanho grande. Não foi possível definir com exatidão se as taxas de recuperação de estruturas das fêmeas destas raças acompanharam a proporção de tamanho folicular. Entretanto, Seneda *et al.* (2001), em estudo realizado com vacas Holandesas, observou que 64,2% do total de folículos aspirados eram menores que 4 mm, sendo a taxa de recuperação de oócitos a partir de folículos menores que 4 mm maior quando comparada a folículos maiores que 4 mm.

As taxas de recuperação de oócitos variam bastante de estudo para estudo, principalmente em fêmeas *Bos taurus* var. *taurus* (SENEDA *et al.*, 2001; ROOVER *et al.*, 2005), onde estes percentuais tendem a ser mais baixos quando comparados a fêmeas *Bos taurus* var. *indicus* (VIANA *et al.*, 2010). Em nosso experimento, a eficiência de recuperação, tanto para Flamenga quanto para Holandesa, pôde ser considerada adequada, com taxas de recuperação de 74,7% e 70,3%, respectivamente. Seneda *et al.* (2001) e Roover *et al.* (2008), com fêmeas da raça Holandesa e Belgian Blue, respectivamente, obtiveram uma eficiência de aspiração de 64,4% e 58,0% de taxa de recuperação oocitária, valores abaixo dos observados em nosso estudo, que se assemelhou mais aos experimentos de Viana *et al.* (2010), com fêmeas *Bos taurus* var. *indicus* (Nelore), os quais obtiveram 70,0% de taxa de recuperação de oócitos. As variadas fontes literárias sugerem a existência de grande variabilidade na taxa de recuperação de oócitos em vacas *Bos taurus* var. *taurus*, sendo que esta variabilidade não parece estar marcadamente presente em fêmeas *Bos taurus* var. *indicus*. Nossos estudos não demonstraram uma grande variabilidade de resposta nas fêmeas Flamenga e Holandesa, as quais apresentaram valores de recuperação oocitária que se assemelharam mais aos padrões de fêmeas *Bos taurus* var. *indicus*.

A quantidade de oócitos viáveis obtidos através da aspiração por OPU apresentou-se similar aos resultados encontrada em outros estudos realizados com *Bos taurus*, com as fêmeas da raça Flamengo e Holandesa apresentando valores médios de recuperação de 8,0 e 7,3 oócitos viáveis por fêmea por coleta, semelhantes aos encontrados por Chaubal *et al.* (2007) (n = 7,8 oócitos/fêmea/coleta) utilizando vacas cruzadas Red Angus, e Bordignon *et al.* (1997) (n = 9,9 oócitos/fêmea/coleta) utilizando fêmeas Holandesas. Porém, Lopes *et al.* (2006), trabalhando com vacas Holandesas e Vermelhas da Dinamarca, e Hasler *et al.* (1995), trabalhando com vacas Holandesas, encontraram valores menores (n = 2,8 e n = 4,1 oócitos/fêmea/coleta, respectivamente) aos encontrados neste estudo, utilizando metodologia semelhantes.

A qualidade dos COCs viáveis diferiu entre as duas raças neste estudo, com vantagem para a raça Flamengo, o que pode demonstrar uma maior reserva folicular. Sabe-se que a qualidade dos oócitos oriundos de OPU possui uma alta variabilidade (ROOVER *et al.*, 2008), tendo certa predominância de oócitos com graus de qualidade desejáveis (RIZOS *et al.*, 2005). Em estudo de aspiração folicular por OPU de fêmeas Holandesas a intervalos semanais, Lopes *et al.* (2006) demonstraram que, em média, 18,5% dos oócitos obtidos por OPU eram GI; 27,0% GII; 31,5% GIII; e 23,0% GIV, ou seja, quase metade dos oócitos eram de excelente a boa qualidade (GI e GII), com 77,0% dos oócitos sendo viáveis. Resultados ainda mais expressivos de viabilidade foram observados por Tamassia *et al.* (2003), que obtiveram 51,3% GI; 30,8 GII; 10,1% GIII; e 7,8% GIV. Tais resultados contrastam aos obtidos em nosso estudo, pois observamos uma menor proporção de oócitos de excelente qualidade (GI), apesar do total de oócitos viáveis ser elevado (raça Flamengo: 7,5% GI; 41,9% GII; 39,0% GIII; e 13,1% GIV; raça Holandesa: 7,9% GI; 33,1% GII; 48,2% GIII; e 10,8% GIV) e semelhante ao observado por Tamassia *et al.* (2003). Desta forma, apesar da

recuperação oocitária ter sido adequada, o número de oócitos de maior competência foi menor neste estudo.

Devido a raça Flamengo encontrar-se em risco eminente de extinção, durante o início do P1, todas as estruturas eram colocadas na PIV, mesmo as classificadas como grau IV. A taxa média de clivagem obtida após a PIV de oócitos oriundos de OPU, na raça Flamengo (49,6%), foi semelhante aos valores achados por Rizos *et al.* (2005) em vacas da raça Holandesa, o qual apresentou 48,7%. Este resultado foi superior ao obtido por Aller *et al.* (2010), com fêmeas da raça Angus, com 16,6% de taxa de clivagem, e inferior ao obtido por Tamassia *et al.* (2003), que utilizando animais da raça Holandesa, obtiveram uma taxa de clivagem média de 79,2%. Em nosso estudo, vacas Holandesas apresentaram uma baixa taxa de clivagem, com média de 32,8%. As baixas taxas de clivagem neste estudo parecem estar associadas a uma menor quantidade de oócitos de excelente a boa qualidade, resultando, por conseguinte, em baixas taxas de blastocistos, sendo de 11,8 e 7,2% para animais das raças Flamengo e Holandesa, respectivamente. Apesar de baixos, os resultados de produção de embriões viáveis após PIV neste estudo foram semelhantes às encontradas por Rizos *et al.* (2005) e Aller *et al.* (2010), que obtiveram em seus estudos taxas de 8,1 e 5,5%, respectivamente, mas ainda significativamente menores que as taxas de Tamassia *et al.* (2003), que utilizando vacas Holandesas, obtiveram uma média de 28,8% de blastocistos, e de Pontes *et al.* (2011), que obtiveram 37,3% de blastocistos de vacas Nelore.

O oócito fecundado *in vivo* geralmente é doado pelo folículo saudável, durante uma fase específica do ciclo estral, enquanto que oócitos colhidos para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em fases distintas do ciclo estral, portanto, expostos a diferentes concentrações de estrógenos e gonadotrofinas, sendo que fatores como estes podem afetar a competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro* (WIT; WURTH; KRUIP, 2000). As taxas de clivagem e blastocistos de

oócitos oriundos de ovários de abatedouro neste estudo nos permitem dizer que o sistema de produção de embriões *in vitro* estava adequado ao experimento. Portanto, quando baseamos esta taxa de clivagem sobre o total de COCs cultivados, o que demonstra o potencial de desenvolvimento de embriões hábeis em serem fecundados, as taxas de blastocisto mais uma vez demonstram o efeito da qualidade oocitária não somente sobre o potencial de desenvolvimento, mas também sobre a fertilidade dos gametas frente à FIV. Conforme observado em nosso experimento e na literatura, as taxas de clivagem e blastocistos para fêmeas *Bos taurus* var. *taurus* são comparáveis às taxas obtidas com fêmeas *Bos taurus* var. *indicus* (PONTES *et al.*, 2010), com divergências de resultados estando mais provavelmente relacionadas à qualidade oocitária do que o fator racial *per se*, o que parece ter sido observado neste estudo.

A variabilidade individual também tem papel fundamental na recuperação de estruturas a partir de OPU (PONTES *et al.*, 2009; SENEDA *et al.*, 2001). A quantidade e qualidade de oócitos podem estar relacionadas com a idade dos animais, onde animais mais velhos tendem a ter uma quantidade maior de oócitos e estruturas de pior qualidade recuperadas em cada seção de aspiração, o que pode afetar o desenvolvimento embrionário subsequente aos procedimentos de PIV de embriões (SU *et al.*, 2009). No presente trabalho, tanto as vacas Flamengas quanto as Holandesas apresentaram uma variação individual bastante pronunciada. Contudo, percebeu-se que animais mais jovens pareceram ter uma variabilidade maior em relação à quantidade e qualidade de estruturas recuperadas, mas com um número maior de estruturas recuperadas (LEROY *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2009). Neste estudo, uma fêmea da raça Flamengo apresentava mais de 7 anos e outra estava com 3,5 anos de idade, sendo que estes animais foram os que apresentaram uma quantidade maior de oócitos viáveis após cada seção de OPU. Da mesma forma, vacas da raça Holandesa com 7,5 anos e 4,4 anos também apresentaram taxas adequadas de recuperação de estruturas viáveis.

Interessantemente, estas foram as fêmeas que apresentaram o maior potencial de produção de embriões viáveis após a PIV, demonstrando que a qualidade oocitária após a OPU apresenta-se como um fator de importância na obtenção de embriões PIV, corroborando com Krisher (2004). Entretanto, a variação individual pôde ter influenciado no resultado final, no caso de fêmeas da raça Flamengo, pois a fêmea que mais forneceu oócitos após a OPU não foi a que mais gerou embriões após a PIV.

### **3.5.2. EFICIÊNCIA DA TE E COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE OS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PARA FÊMEAS DAS RAÇAS FLAMENGA E HOLANDESA**

Na América do Sul, incluindo o Brasil são coletados, em média, seis embriões viáveis por procedimento de SOV (THIBIER, 2009). Em estudos prévios realizados por Hansen e Block (2004) e Castro Neto *et al.* (2005), a partir de fêmeas de origem europeia, e por Peixoto *et al.* (2006) com animais zebuínos, as médias de embriões viáveis produzidos *in vivo* se situam entre 4 e 6 estruturas por animal, e entre 4 a 8 estruturas viáveis por animal, respectivamente para cada *background* genético, conforme acima. Estes valores se assemelham aos resultados obtidos em nosso experimento, utilizando procedimentos semelhantes, alcançando-se as médias de 7,5 e 3,7 embriões viáveis para as raças Flamengo e Holandesa, respectivamente, o que demonstrou não existir uma grande variação nas médias obtidas a partir destas raças, conforme esperado, estando o experimento em conformidade com a literatura atual.

Semelhante ao que ocorreu com a PIV, fêmeas da raça Flamengo produziram mais embriões viáveis através da produção *in vivo* quando comparadas a fêmeas da raça Holandesa. Desta forma, fêmeas da raça Flamengo parecem serem mais eficientes para a produção de embriões viáveis a partir dos dois métodos de produção de embriões, nas nossas condições

experimentais. Variações individuais parecem estar menos presentes pela TE quando comparada à OPU/PIV (PONTES *et al.*, 2009). Neste sentido as duas técnicas poderiam ser utilizadas de forma adequada a cada animal, sendo os melhores indivíduos identificados para aplicação da técnica mais eficiente. Outro dado importante que pode determinar a opção por tecnologias são as diferenças morfológicas, bioquímicas e metabólicas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (HANSEN e BLOCK, 2004). Embriões produzidos *in vitro* de fêmeas da raça Holandesa, por exemplo, possuem um alto grau de apoptose durante o desenvolvimento ao estágio de blastocisto quando comparado com embriões obtidos pelo método *in vivo* (GJØRRET *et al.*, 2003). Baseado nisto, podemos observar que embriões produzidos *in vivo* possuem uma melhor qualidade morfológica do que os produzidos *in vitro*, o que apresenta uma relação direta com a viabilidade embrionária após a TE (FARIN e FARIN, 1995).

A utilização da técnica de coleta aumentou a taxa de recuperação final de estruturas totais e viáveis neste experimento, corroborando com os resultados relatados em outros estudos como os realizados por Castro Neto *et al.* (2005) e Cruz *et al.* (2008), os quais observaram um aumento médio de 3 a 4 estruturas nos procedimentos de coleta. Para a raça Flamengo, obteve-se uma média de 11,1 embriões recuperados, sendo 70,8% (n = 126) na coleta e 29,2% (n = 52) na recoleta. A taxa de recuperação total de estruturas foi menor na raça Holandesa, com uma média de 5,0 estruturas/animal/sessão. Porém, recuperaram-se mais estruturas na recoleta, sendo 58,8% (n = 47) de embriões coletados e 41,2% (n = 33) de embriões recuperados na recoleta. Cruz *et al.* (2008), utilizando vacas da raça Jersey, obtiveram em média 10,8 estruturas embrionárias provenientes de SOV, sendo coletados 75,0% (n = 8,1) dos embriões na coleta e 25,0% (n = 2,7) na recoleta, semelhante aos dados de recuperação observados para a raça Flamengo. O fator raça, o maior número de animais

coletados neste estudo e a execução da técnica *per se* podem ter influenciado os resultados neste experimento.

Em termos de número total de embriões viáveis no Dia 7 de desenvolvimento, e dentro de intervalos fisiológicos aplicáveis para a obtenção de embriões por TE (duas seções de SOV com intervalo de 63 dias) ou OPU-PIV (10 seções a intervalos semanais ao longo de 63 dias), a TE resultou em quase o dobro de estruturas viáveis do que a OPU/PIV, para ambas as raças. A raça Flamengo demonstrou um maior potencial de produção *in vivo* de embriões quando comparado ao sistema *in vitro*, com a obtenção de 111 ( $n = 15,9$  embriões/fêmea por período) e 63 ( $n = 7,9$  embriões/fêmea por período) embriões viáveis, respectivamente, sendo também quase duas vezes mais eficiente, em ambos os sistemas do que a raça Holandesa ( $n = 48$  embriões, ou  $8,0$  embriões/fêmea por período para a TE, e  $n = 34$ , ou  $4,3$  embriões/fêmea por período para a OPU/PIV). Com vacas da raça Holandesa, Pontes *et al.* (2009) demonstraram que a produção de embriões viáveis por TE e a obtenção de oócitos por OPU foram diretamente proporcionais, onde a que mais produziu oócitos viáveis por OPU foi a que mais produziu embriões viáveis através da TE, sendo esta relação semelhante ao encontrado em nosso experimento utilizando vacas da raça Holandesa, e diferente do observado para vacas da raça Flamengo.

Em síntese, pelos resultados apresentados no presente trabalho, a produção *in vivo* de embriões parece ser a biotécnica mais adequada para a multiplicação de animais da raça Flamengo. Em adição, dentre todos os parâmetros estudados, esta raça também demonstrou um melhor desempenho em relação à raça Holandesa no que diz respeito ao número de folículos visualizados e aspirados e na taxa de blastocistos obtida após a PIV, e na produção *in vivo* de embriões viáveis pela TE. Contudo, com o melhoramento e aprimoramento das técnicas e procedimentos, a OPU/PIV também poderá alcançar níveis eficientes para a

preservação da raça Flamenga. Futuras investigações a respeito das características reprodutivas da raça Flamenga ainda se fazem necessárias.



### 3.6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- (a) Fêmeas da raça Flamengo foram mais eficientes que fêmeas da raça Holandesa quanto à aplicação das biotecnologias reprodutivas utilizadas nestes experimentos (OPU/PIV e TE), resultando em um maior número de folículos aspirados, número (total e viáveis) e qualidade morfológica de CCOs recuperados por sessão de OPU, e número de embriões viáveis produzidos por OPU/PIV ou pela TE.
- (b) O procedimento de TE apresentou uma maior eficiência do que a OPU/PIV para a produção de embriões bovinos, independente da raça. Contudo, ambas as biotecnologias reprodutivas (TE e OPU/PIV) se mostraram eficazes como ferramentas úteis para a conservação genética e multiplicação de animais da raça Flamengo.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; RÍOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science** 119:1-8, 2010.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part 1: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animal** 45:171-179, 2010.
- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science** 99:223-243, 2007.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology** 56:1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology** 65:77-88, 2006.
- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology** 42:895-907, 1994.
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia** 56(3):184-194, 2009.
- BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science** 79:203-244, 2003.
- BETTERIDGE, K.J. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. **Theriogenology** 65:905-913, 2006.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.F.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science** 39:193-204, 1995.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** 78:307-326, 2003.
- BÓ, G.A.; GUERRERO, D.C.; ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology** 69:81-87, 2008.
- BÓ, G.A.; TRÍBULO, A.; RAMOS, M.; GUERRERO, D.C.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; ROGAN, D.; MAPLETOFT, R.J. Simplification of superovulation protocols in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae** 38(2):277-315, 2010.
- BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology** 45:1115-1128, 1996.
- BOLS, P. E. J., VANDENHEEDE, J.M.M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology** 43:677-687, 1995.

- BOLS, P. E. J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology** 45:1001-1014, 1996.
- BOLS, P. E. J., YSEBAERT, M.T., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology** 47:1221-1236, 1997.
- BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology** 62:906-914, 2004.
- BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L.C. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology** 48:291-298, 1997.
- BROGLIATTI, G. M., ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepurpupal calves. **Theriogenology** 45:1163-1176, 1996.
- BUNN, S. Embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados com diferentes crioprotetores. In: **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 82-84, Goiânia, 2005.
- BURRIEL, M. I.; RODELLAR, C.; LENESTRA, J.A.; SANZ, A.; CONS, C.; OSTA, R.; RETA, M.; ARGÜELLO, S.; SANZ, A.; ZARAGOZA, P. Genetic diversity and relationships of endangered Spanish cattle breeds. **Journal of Heredity** 98(7):687-691, 2007.
- CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T.; GREVE, T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science** 42:215-226, 1996.
- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology** 63:1249-1255, 2005.
- CHAGAS, L.M.; BASS, J.J.; BLACHE, D.; BURKE, C.R.; KAY, J.K.; LINDSAY, D.R.; LUCY, M.C.; MARTIN, G.B.; MEIER, S.; RHODES, F.M.; ROCHE, J.R.; THATCHER, W.W.; WEBB, R. *Invited Review*: New Perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science** 90:4022-4032, 2007.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology** 67:719-728, 2007.
- CHAUBAL, S.A.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; FERRE, L.B.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; RIESEN, J.W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology** 65:1631-1648, 2006.
- COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction, Nutrition and Development** 40:493-504, 2000.

- COSTA, L.L.; SILVA, J.C.; SILVA, J.R. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology** 56:65-77, 2001.
- CRUZ, F.B.; ORTIGARI JUNIOR, I.; VIEIRA, A.D.; GERGER, R.P.C.; RIBEIRO, E.S.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Uterine re-flushing as a strategy to improve embryo recovery rate in dairy and beef cattle. **Acta Scientiae Veterinarie** 36:249-254, 2008.
- DAYAN, A., WATANABE, M.R., WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS** 28(1):181-185, 2000.
- DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, C.H. Effects of Ovum Pick-Up Frequency and FSH Simulation: A retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. **Reproduction in Domestic Animal** 43:239-245, 2008.
- DE ROOVER, R.; GENICOT, G.; LEONARD, S.; BOLS, P.; DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science** 86:13-25, 2005.
- ELIAS, A.C. **O centenário do Herd-Book Collares**. 1.ed. Pelotas: Futura Comunicação & Marketing, p. 181-184, 365 p., 2006.
- ETHERINGTON, W.G.; KINSEL, M.L.; MARSH, W.E. Relationship of production to reproductive performance in Ontario dairy cows: herd level and individual animal descriptive statics. **Theriogenology** 46:935-959, 1996.
- EVANS, A.C.O.; MOSSA, T.F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J. Variation in the number of ovarian follicles in cattle: possible causes and consequences. **Acta Scientiae Veterinarie** 38:537-543, 2010.
- FABER, D.C.; FERRÉ, L.B. Advancements in reproductive technology in cattle. **Proceedings of Beef Improvement Federation** Sioux Falls, South Dakota, 25-28 MAY, 2004.
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICHS, C.L.; ZWAAG, D.F.V.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology** 59:125-138, 2003.
- FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology of Reproduction** 52:676-682, 1995.
- FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science** 80:1-10, 2002.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science** 78:135-163, 2003.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology** 55:1341-1357, 2001.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology** 59:599-616, 2003.

- GJØRRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; HYTTEL, P.M. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction** 69:1193–1200.
- GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology** 51:951-961, 1999.
- GORDON, I.R. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 2. Ed. CABI: London, UK, 42-78, 2003
- GOULDING, D.; WILLIAN, D.H.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology** 34:767-778, 1990.
- GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal of Reproduction and Fertility** 91:81-89, 1991.
- HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle- an overview. **Theriogenology** 65:119-125, 2006.
- HANSEN, P.J.; BLOCK, J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction, Fertility and Development** 16:1-14, 2004.
- HASHIMOTO, S., TAKAKURA, R., KISHI, M., SUDO, T., MINAMI, N., YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology** 52:131-138, 1999.
- HASLER, J.F. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. **Theriogenology** 65:4-16, 2006.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEM, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology** 43:141-152, 1995.
- HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society of London** 48:457-459, 1890.
- HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. **The Role of Biotechnology**. Villa Gualino, Turin, Italy, 5-7 March, p: 12, 2005.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology** 52:683-700, 1999.
- HOLT, W.V.; PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction** 4:143-150, 1999.

- HUMBLOT, P.; LE BOURHIS, D.; FRITZ, S.; COLLEAU, J.J.; GONZALEZ, C.; JOLY, C.G.; MALAFOSSE, A.; HEYMAN, Y.; AMIGUES, Y.; TISSIER, M.; PONSART, C. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. **Veterinary Medicine International**. Proceedings of the 26th AETE meeting Kuopio 10-11th September 2010, p 105. [http://www.aete.eu/pdf\\_publication/29.pdf](http://www.aete.eu/pdf_publication/29.pdf).
- IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development** 23:1-14, 2011.
- JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature** 428:145–150, 2004.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; EORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D.T.; TILLY, J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell** 122:303–315, 2005.
- KATSKA, L.; RYNSKA, B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. **Theriogenology** 50:213-222, 1998.
- KATSKA L, SMORAG, Z., Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science** 7:451-460, 1984.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science** 82:E14-E23, 2004.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science** 48:76-86, 1979.
- LEON-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F.J.; MORENO, J.M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science** 112:347-361, 2009.
- LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P.E.J.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology** 64:2022-2036, 2005.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; MMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science** 76:1216-1231, 1998.
- LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA, J.Jr.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature Biotechnology** 19:962-964, 2001.
- LOONEY, C. R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology** 41:67-72, 1994.

- LONG, J. L. Rare livestock breeds: The impacts of diminishing genetic diversity on the future of Agriculture. **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 91-94, Belo Horizonte, 2009.
- LOPES, A.S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animal** 41:196-203, 2006.
- LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science** 84:1277-1293, 2001.
- LUCY, M.C.; Mc DOUGALL, S.; NATION, D.P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lacting dairy cows in feed lot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science** 82-83:495-512, 2004.
- LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology** 43:270-275, 1995.
- MATOS, M. H. T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31:433-442, 2007.
- McEVOY, T.G.; ALINK, F.M.; MOREIRA, V.C.; WATT, R.G.; POWELL, K.A. Embryo technologies and animal health – consequences for the animal following ovum pick-up, *in vitro* embryo production and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology** 65:926-942, 2006.
- MEINTJES, M., BELLOW, M.S., BROUSSARD, J.R., PAUL, J.B., GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for *in vitro* fertilization. **Journal of Animal Science** 73:967-974, 1995.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology** 59:651-676, 2003.
- MOORE, K.; THATCHER, W.W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 89:1254-1266, 2006.
- PARRISH, J.J.; PARRISH, J.S.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction** 38:1171-1180, 1988.
- PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 58(4):567-574, 2006.
- PIETERSE, M. C., KAPPEN K. A., KRUIP, Th.A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology** 30(4):751-762, 1988.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology** 71:690-697, 2009.

- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Indicus taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology** 74:1349-1355, 2010.
- PONTES, J.H.F.; STERZA, F.A.M.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology** 75:1640-1646, 2011.
- REECE, W.O. **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 381-417, 2008.
- REVEL, F.L., MERMILLOD, P., PEYNOT, N., RENARD, J.P., HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility** 103:115-120, 1995.
- RIBEIRO, E.S.; GERGER, R.P.C.; OHLWEILER, L.U.; ORTIGARI JUNIOR, I.; MEZZALIRA, J.A.; FORELL, F.; BERTOLINI, L.R.; RODRIGUES, J.L.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A.; MEZZALIRA, A.; BEROLINI, M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning and Stem Cells** 11(3):377-386, 2009.
- RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J.F.; O'FARRELL, K.J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology** 63:939-949, 2005.
- ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrus cycle. **Theriogenology** 42:917-929, 1994.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Illinois. p. 109-122, 1998.
- ROOSEN, J.; FADLAOUI, A.; BERTAGLIA, M. Economic evaluation for conservation of farm animal genetic resources. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 122:217-228, 2005.
- RUIZ, L.L.; ALVAREZ, N.; NUNEZ, I.; MONTES, I.; SOLANO, R.; FUENTES, D.; PEDROSO, R.; PALMA, G.A.; BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology** 45:292, 1996. Abstract.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª. Ed. Belo Horizonte: FEP MVZ, 265p, 2002.
- SANTOS, R. R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32:9-15, 2008.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction** 141:1-19, 2011.
- SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. In: **Anais da XIII Reunião Anual da SBTE**, v. 26, n. 1, p. 141-145, Atibaia, 1998.



- SCHOEVERS, E.J.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A.J. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines *in vitro* embryo development of sow oocytes. **Theriogenology** 67:1108-1122, 2007.
- SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science** 59:1026-1046, 1984.
- SENATORE, E.M.; XU, J.; NOVOA, M.V.S.; GONG, G.; LIN, T.; BELLA, A.; MORENO, J.F.; MANNINO, M.E.; TIAN, X.; PRESICCE, G.A.; WU, S.-C.; DU, F. Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. **Theriogenology** 74:1643-1651, 2010.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J.A.; NASCIMENTO, A.B. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology** 59:1435-1440, 2003.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science** 67:37-43, 2001.
- SENEDA, M.M.; BALSCHI, W. Ovum pick-up: considerações técnicas. **Anais do 1º simpósio internacional de reprodução animal aplicada**. P.223-230, Londrina, 2004.
- SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., PUELKER, R.Z., OLIVEIRA, J.A. Obtenção de embriões bovinos em um caso de obstrução uterina. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, 28(1):331, 2000. Abstract.
- STABENFELD, G.H.; DAVIDSON, A.P. Controle do desenvolvimento das gônadas e dos gametas. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 385-392, 2004.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual of International Embryo Transfer Society (IETS). 3. ed. Illinois: **International Embryo Transfer Society**, 173p, 1998.
- SU, L.; YANG, S.; HE, X.; LI, X.; MA, J.; WANG, Y.; PRESICCE, G.A.; JI, W. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. **Reproduction in Domestic Animal** doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01349.x., 2009.
- TABERLET, P.; VALENTINI, A.; REZAEI, H.R.; NADERI, S.; POMPANON, F.; NEGRINI, R.; AJMONE-MARSAN, P. Are cattle, sheep and goats endangered species? **Molecular Ecology** 17:275-284, 2008.
- TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, J.P.; MAILLARD, S.C. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproduction** 126:629-637, 2003.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology** 55:75-89, 2001.
- THALER NETO, A.; MÜHLBAUER, M.D.; ZARDO, W.F.; RAMOS, J.C. Factors affecting milk yield and lactation period in a Flemish and Holstein herd in upland of Santa Catarina state – Brazil. **Ciência Rural** 26:123-128, 1996.
- THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. **Reproduction in Mammals and Man**. Paris : Ellipses. 801 p., 1993.

- THIBIER, M. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2008. The worldwide statistics of embryo transfer in farm animals. **International Embryo Transfer Society Newsletter** 27(4):13-19, 2009.
- THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reproduction, Nutrition and Development** 45:235-242, 2005.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum Pick Up and *In Vitro* Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology** 65:914-925, 2006.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.W.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.G.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology** 53:575-597, 2000.
- VAN WEZEL, I.; RODGERS R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction** 55:1003-1011, 1996.
- VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology** 73:966-972, 2010.
- VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology** 37:23-37, 1992.
- WIT, A.A.; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science** 78:1277-1283, 2000.