



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**KARINA CRISTINA PUGGESI RUBIN**

**PARTICULARIDADES REPRODUTIVAS DA RAÇA NELORE  
NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)**

---

Londrina  
2006

**KARINA CRISTINA PUGGESI RUBIN**

**PARTICULARIDADES REPRODUTIVAS DA RAÇA NELORE  
NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de concentração em Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. Seneda

Londrina  
2006

**KARINA CRISTINA PUGGESI RUBIN**

**PARTICULARIDADES REPRODUTIVAS DA RAÇA NELORE  
NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana de Andrade Melo Sterza

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello Martins

Londrina, 14 de julho de 2006.

## DEDICATÓRIA

*À minha família, Sidnei, Fátima,  
Márcia, Matheus e Gabriel minha eterna  
gradidão a vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me dado tão grande oportunidade e por ter me feito forte e perseverante em meus objetivos.

À minha família, Sidnei, Fátima e Márcia, pelo incentivo e apoio nas horas de maior dificuldades e por compartilharem os momentos alegres nesta etapa da minha vida. Eu sempre soube que poderia contar com vocês.

Aos meus sobrinhos, Renata, Matheus e Gabriel, por tantos momentos de orgulho e alegria.

Ao meu noivo, Juliano, pelo carinho e atenção nos momentos em que necessitei de apoio.

Ao meu cunhado, Lothar, por sempre estar disposto a me ajudar.

Aos meus avós Justina e Armando, pelos belos exemplos de honra e dignidade.

Aos meus primos, tios e tias, especialmente, tio José e tia Nide, pelo apoio e ajuda neste período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pela amizade e por toda ajuda que me deu.

Às colegas de laboratório que foram leais companheiras e não mediram esforços em me ajudar.

Aos Médicos Veterinários José Henrique Fortes Pontes e Ismael Nonato Júnior que me deram condições para realização deste trabalho.

A todos os alunos, funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar até aqui.

Minha eterna gratidão a todos vocês!

RUBIN, Karina Cristina Puggesi. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE)**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, e é também o maior produtor mundial de embriões produzidos *in vitro*, embora a principal raça nacional – Nelore – que é a mais explorada para PIVE, tenha suas particularidades reprodutivas pouco conhecidas. O objetivo deste estudo foi analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala. O estudo baseou-se numa análise de dados obtidos da Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda, no período de janeiro de 2001 a maio de 2006. Foram selecionadas 420 doadoras da raça Nelore, de alto valor genético, com idades variando de 2 a 8 anos (média de 5 anos), que foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia. As cinco doadoras de maior produção foram analisadas separadamente, a fim de se evidenciar o impacto dos animais de alta produção. Não houve estímulo hormonal em nenhuma das doadoras. Foi utilizado sêmen de 74 touros provenientes de centrais de colheita de sêmen. Ao final de 1504 aspirações, obteve-se 27966 oócitos, sendo 22809 (81,6%) viáveis e 5157 (18,4%) inviáveis. A média de oócitos viáveis por aspiração folicular foi de 15,2. Obtêve-se 7725 embriões e 2585 prenhez (1,7 prenhez/aspiração). Do total de prenhez obtido, subtraindo-se as mortes embrionárias, a eficiência foi de 29,9% (2312/7725), ou seja, 1,5 prenhez/aspiração. Os números obtidos contrastam com os da literatura para gado europeu, demonstrando uma eficiência no processo de produção de embriões *in vitro* muito superior para a raça Nelore – cerca de quatro vezes mais embriões. Tal aspecto deve-se a características fisiológicas pouco conhecidas desta raça. A partir desta constatação, serão propostas estratégias experimentais para elucidar os mecanismos envolvidos com a maior produção folicular e o melhor rendimento da raça Nelore no processo de produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** PIVE. Embriões. Oócitos. Aspiração folicular. OPU.

RUBIN, Karina Cristina Puggesi. **Reproductive peculiarities of Nelore breed in the embryos *in vitro* production (EIVP)**. 2006. 53f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## ABSTRACT

Brazil has the most commercial herd of cattle of the world, and is also in the first place among countries of the world in embryos *in vitro* production, though the main national breed – Nelore – has its unfamiliar peculiarities. The object of this study was to analyse the reproductive peculiarities of Nelore cows (*Bos taurus indicus*) on the large scale process of embryos *in vitro* production. The study analysed data obtained of the Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda, from January of 2001 to May of 2006. It was selected 420 Nelore donors, of high genetic value, with ages between 2 and 8 years (average 5 years), that were submitted to follicular aspiration guided by ultrasound. The five donors of higher production were analysed in separate to show the impact of the animals of high production. There was not hormonal stimulus in the donors. It was used semen from 74 bulls proceeding from semen collection centers. At the end of 1.504 aspirations, 27.966 oocytes were obtained, 22.809 of which (81,6%) were viable and 5.157 (18,4%) were not viable. The viable oocytes average obtained per follicular aspiration was 15,2. It was obtained 7725 embryos and 2585 pregnancies (1,7 pregnancies/aspiration). Considering the total of pregnancies obtained, and not considering the embryonic deaths, the efficiency was of 29,9% (2312/7725), in the other words, 1,5 pregnancies/aspirations. The numbers which were obtained contrast with the ones from the literature for *Bos Taurus*, showing an efficiency in the process of embryos *in vitro* production much higher for the Nelore breed – about four times more embryos. This aspect is due to physiological characteristics which are not much known considering this breed. From this fact on, experimental strategies will be proposed to elucidate the mechanisms involved with the biggest follicular production and the best performance of Nelore breed in the process of embryos *in vitro* production.

**Keywords:** EIVP. Embryos. Oocytes. Follicular aspiration. OPU.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Produção de oócitos, embriões e prenhez obtidos a partir de vacas Nelore submetidas à aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006 .....32
- Tabela 2.** Proporção de fetos machos, fêmeas, não sexados e as perdas de gestação obtidos a partir de embriões Nelore produzidos por aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006 .....33
- Tabela 3.** Porcentagem de prenhez e eficiência obtida em relação ao estágio embrionário dos embriões produzidos *in vitro*, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006 .....34
- Tabela 4.** Produção de oócitos, embriões, prenhez e eficiência das melhores doadoras Nelore submetidas à aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006 .....35



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BE</b>	–	Blastocisto Eclodido
<b>BI</b>	–	Blastócito Inicial
<b>BL</b>	–	Blastocisto
<b>BN</b>	–	Blastocisto em Eclosão
<b>BR</b>	–	Blastocisto Retirado
<b>BSA</b>	–	Albumina Sérica Bovina
<b>BST</b>	–	Somatotrofina Bovina
<b>BX</b>	–	Blastocisto Expandido
<b>CO<sub>2</sub></b>	–	Gás Carbônico
<b>DPBS</b>	–	Dulbecco Tampão Fosfato Salina
<b>FIV</b>	–	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	–	Hormônio Folículo Estimulante
<b>G</b>	–	Gauge
<b>GL</b>	–	Gay Lussac
<b>LH</b>	–	Hormônio Luteinizante
<b>MC</b>	–	Mórula Compacta
<b>MHz</b>	–	Mega hertz
<b>MIV</b>	–	Maturação <i>in vitro</i>
<b>mm de HG</b>	–	Milímetros de Mercúrio
<b>MO</b>	–	Mórula
<b>OPU</b>	–	Ovum Pick Up
<b>PBS</b>	–	Tampão Fosfato Salino
<b>pH</b>	–	Potencial Hidrogeniônico
<b>PIV</b>	–	Produção <i>in vitro</i>
<b>PIVE</b>	–	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
<b>SOB</b>	–	Superovulação
<b>SOFaa</b>	–	Fluido de Oviduto Sintético Modificado
<b>TCM</b>	–	Meio de Cultura de Tecidos
<b>TE</b>	–	Transferência de Embriões
<b>UI</b>	–	Unidades Internacionais

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 RECUPERAÇÃO DOS OÓCITOS .....	14
1.2.1 Aspiração folicular dos oócitos de abatedouro .....	14
1.2.2 Aspiração folicular guiada por ultra-sonografia .....	15
1.2.3 Seleção e classificação dos oócitos .....	16
1.3 MATURAÇÃO IN VITRO.....	17
1.4 FERTILIZAÇÃO IN VITRO.....	18
1.5 CULTIVO IN VITRO .....	19
1.6 SITUAÇÃO ATUAL DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	22
Resumo .....	23
Abstract .....	24
Introdução .....	25
Materiais e Métodos .....	27
Local.....	27
Animais.....	27
Aspiração Folicular .....	28
Seleção dos oócitos .....	29
Maturação <i>in vitro</i> .....	29
Fecundação <i>in vitro</i> .....	30
Cultivo <i>in vitro</i> .....	30
Transferência dos embriões .....	31
Diagnóstico de gestação, avaliação da morte embrionária e identificação do sexo fetal .....	31

Resultados .....	32
Discussão .....	36
Referências Bibliográficas .....	41
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 INTRODUÇÃO

As fêmeas bovinas nascem com mais de 100.000 oócitos em seus ovários (GORDON, 2003). No entanto, pelas vias naturais, apenas 0,01% de produtos viáveis podem ser gerados, ou seja, um número próximo a dez descendentes em toda sua vida reprodutiva (BOLS, 1997). Desta forma, a utilização de biotécnicas para incremento do aproveitamento dos oócitos tem sido um constante desafio para os pesquisadores.

Uma das soluções para esse problema foi o desenvolvimento da técnica da transferência de embriões (TE), pela qual se obtém um número elevado de embriões em um mesmo ciclo estral através da superovulação farmacológica. Segundo Bols (1997), em um programa de TE, cada doadora pode multiplicar em mais de três vezes o número de descendentes de sua vida reprodutiva. Por outro lado, ainda não existe um protocolo que permita eliminar, ou mesmo reduzir, de forma significativa, a variabilidade nos resultados de superovulação (SOV) (GONÇALVES et al.; 2002). Cerca de 20 a 30% dos animais não respondem ao tratamento superovulatório, enquanto que outros 20 a 30% respondem apenas modestamente e com baixas taxas de fertilização (NONATO JR, 2005). Segundo Reichenbach (2003) apenas um terço das doadoras apresentam uma resposta com produção de no mínimo seis embriões viáveis por colheita.

Devido a difícil aplicabilidade da TE e da crescente demanda e necessidade de embriões para fins de pesquisa, outros caminhos foram investigados para se produzir embriões bovinos em larga escala, principalmente quanto ao aprimoramento da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) da espécie bovina (GARCIA et al.; 2003).

Os registros indicam que os primeiros estudos com maturação *in vitro* e subsequente fecundação, em bovinos, foram os de Iritani e Niwa (1977) relacionando a morfologia dos oócitos bovinos com a capacidade de maturação *in vitro*. Todavia, somente na década de 80 é que foi registrado por Brackett et al. (1982), o nascimento do primeiro bezerro produzido após fecundação *in vitro* de um

oócito ovulado. Nesta mesma década Lu et al. (1987) registraram o nascimento de gêmeos após maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

No Brasil, o nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro* foi em 1993 (WATANABE, 1993), enquanto produtos nascidos por aspiração folicular associada à fertilização *in vitro* ocorreram em 1996 (PEIXER et al.; 1997), sendo que em 2000 foi produzido um bezerro *in vitro* a partir de oócitos oriundos de punção folicular de uma bezerra com três meses de idade.

A produção *in vitro* de embriões é possível em animais jovens, em vacas em início de gestação, em período pós-parto inicial e em doadoras que não respondem à superovulação (PEREZ et al.; 2000). O aprimoramento das condições de cultivo *in vitro*, bem como das técnicas de recuperação de oócitos *in vivo* tornou viável a aplicação da PIVE em escala comercial, sendo importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade da pecuária e pesquisa de novas biotecnologias (GARCIA et al.; 2004).

Na produção bovina, a PIVE ainda apresenta limitações em função da inconsistência dos resultados referentes às taxas e qualidade de mórulas e blastocistos, do custo inicial para construção da infra-estrutura e do tempo consumido para executar a rotina de produção de embriões que vai desde a punção folicular *in vivo* até o desenvolvimento *in vitro* dos embriões (GONÇALVES et al.; 2002). No entanto, com os avanços destas biotécnicas reprodutivas, a produção de embriões apresenta-se em contínua expansão, verificando-se expressivo crescimento na América Latina, particularmente no Brasil (REINCHENBACH, 2003).

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 170 milhões de cabeças, sendo 80% zebuínos ou cruzados com zebu e 90 milhões destes são da raça Nelore (NOGUEIRA, 2004). O país conquistou posição de destaque no ranking das exportações, consolidando-se como maior exportador mundial de carne bovina (PESSUT & MEZZADRI, 2004). É a população bovina mais homogênea do mundo, com 25 milhões de vacas produzindo em ambientes bastante diversificados (FRIES, 1997).

O Brasil também é o primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro*. Este cenário nacional pode ser compreendido por algumas particularidades: a grande quantidade de laboratórios privados com domínio da PIVE, os altos preços alcançados por animais da raça Nelore e, estreitamente

relacionado com esses dois aspectos, a elevada produção de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas desta raça.

Durante o ano de 2003, mais de 60.000 embriões foram gerados por esse método e aproximadamente 87.000 embriões pelo método *in vivo* (THIBIER, 2004). Apesar do expressivo número de embriões obtidos por lavagem uterina, verifica-se uma clara tendência no aumento de embriões produzidos *in vitro*. Em muitos países, a aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões (PIVE) somente são utilizadas como última opção para obtenção de embriões, quando a recuperação pela lavagem uterina é inviável. No entanto, no Brasil, a produção *in vitro* de embriões é muitas vezes a primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e/ou comercial, e isto certamente tem relação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional.

Para fêmeas Nelore, pode-se admitir uma maior quantidade de embriões por procedimento com a PIVE, quando comparada à colheita e transferência de embriões (NONATO JR et al.; 2004). A grande produção de oócitos em Nelore é algo que deve ser ressaltado porque considerando outros aspectos reprodutivos, as divergências entre *Bos taurus* e *Bos indicus* são discretas. Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e a dinâmica de crescimento folicular (ADAYEMO & HEATH, 1980; SARTORELLI et al.; 2005) e, especificamente quanto à obtenção de embriões pela lavagem uterina, as médias obtidas são similares (CASTRO-NETO et al.; 2005). No entanto, quanto ao número de oócitos, vacas Nelore produzem, em média, 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Somatotrofina Bovina (BST) ou controle do ciclo estral (THIBIER, 2004; RUBIN et al.; 2004). Esta média de oócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias (RUBIN et al.; 2005). Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (SENEDA et al.; dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento (SANTOS et al.; 2005).

Ressalta-se que na literatura especializada há uma enorme carência de dados dessas particularidades da raça Nelore, tanto de mecanismos fisiológicos, quanto dos aspectos aplicados das biotécnicas da reprodução. O objetivo do presente trabalho foi analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça

Nelore (*Bos taurus indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala para permitir uma melhor compreensão dos fatores que fizeram o Brasil tornar-se líder mundial nesta biotécnica.

## **1.2 RECUPERAÇÃO DOS OÓCITOS**

Segundo Pieterse et al. (1988), a recuperação de oócitos é a base do programa de PIVE. Há duas maneiras principais de obtenção de oócitos: provenientes de ovários coletados em abatedouros ou recuperados através da punção folicular guiada por ultra-som.

A produção individual de oócitos apresenta uma relativa constância, independentemente do esquema de recuperação utilizado. Observa-se, contudo, uma grande variação entre doadoras, não associada à raça, condição corporal, manejo ou qualquer outra causa aparente, e esta tem sido a principal fonte de variação nos resultados da punção folicular (VIANA, 2002).

### **1.2.1 Aspiração folicular de ovários de abatedouros**

A utilização dos oócitos de vacas de abatedouro atualmente destina-se as pesquisas com transferência nuclear, produção de animais transgênicos, produção *in vitro* e criopreservação de embriões (HOESCHELE, 1990; HASLER et al., 1995). No entanto, a sua utilização apresenta algumas desvantagens, tais como o desconhecimento do estado de saúde ou o padrão hormonal dos animais e a impossibilidade de se repetir a técnica em um mesmo animal.

Yang et al. (1993) demonstraram que oócitos obtidos de ovários coletados em abatedouro, conservados entre 24-25°C em PBS durante 11 horas continuam viáveis, com índice de clivagem e porcentagem de blastocistos comparáveis aos oócitos obtidos logo após o abate.

### 1.2.2 Aspiração folicular guiada por ultra-sonografia

A aspiração folicular guiada por ultra-sonografia ou Ovum Pick Up (OPU) originalmente foi desenvolvida para uso na reprodução humana, mas em 1988, Pieterse et al. (1988) adaptaram a técnica para uso em vacas.

Com o auxílio de um ultra-som e um transdutor acoplado a uma guia de aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos. Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor. Os oócitos são, então, transportados até o laboratório, onde se inicia o processo de produção *in vitro* de embriões (GARCIA et al., 2004).

A aspiração folicular pode obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação, ou mesmo após o parto (2 a 3 semanas, segundo HASLER et al., 1995). Brogliatti & Adams (1996) obtiveram oócitos de bezerras com apenas 6 semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. Sauvé (1998) constatou que vacas gestantes podiam ser submetidas à técnica até o sexto mês de prenhez, sem que fosse notado qualquer prejuízo à gestação ou às vacas.

A aspiração folicular também apresentou-se viável para fêmeas com limitações reprodutivas. São freqüentes os casos de aderência de ovário e útero, metrites crônicas e infecções tubéricas (LOONEY et al., 1994). A OPU-PIVE permite a produção de progênie de fêmeas com tais enfermidades (KRUIP et al., 1994). No entanto, sua aplicação mostrou-se mais ampla quando utilizadas em fêmeas saudáveis, produzindo, no mínimo, quatro vezes mais embriões em relação a TE (KRUIP et al., 1994), além de poder ser repetida várias vezes em um mesmo animal (KRUIP et al., 1991; PIETERSE et al., 1991; BOLS et al., 1995; MEINTJES et al., 1995 e BOLS et al., 1996), inclusive com um aumento no número de folículos após várias semanas de aspirações (STUBBINGS & WALTON, 1995).

Segundo Bols et al. (1997), aspectos biológicos e técnicos influenciam o resultado final da recuperação de oócitos via transvaginal. Entre as considerações técnicas podemos citar o tamanho e tipo da agulha, pressão de vácuo, comprimento do bisel da agulha e a freqüência do transdutor (SENEDA & BLASCHI, 2004).



O intervalo entre as sessões de aspiração folicular influencia a quantidade e a qualidade de oócitos colhidos (MERTON et al., 2003). Segundo Gonçalves et al. (2002), a punção folicular pode ser realizada em duas sessões semanais por alguns meses sem prejudicar o futuro desempenho reprodutivo do animal.

A OPU, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (RODRIGUES & GARCIA, 2000). Segundo Dayan (2002), a OPU não causa efeitos deletérios significativos aos animais, mesmo após cinco meses de punções, duas vezes por semana, no que concerne aos exames de saúde e fertilidade, clínicos ou *post mortem*.

Outra vantagem da realização da aspiração folicular em comparação a TE está ligada ao fato de que não é necessário o tratamento das doadoras com gonadotrofinas (GARCIA et al., 2004), pois mesmo sem tratamento hormonal oócitos imaturos colhidos via transvaginal de animais com ciclo normal podem ser utilizados com sucesso para PIV de embriões viáveis (KRUIP et al., 1991). Assim, muitos estudos tem optado por coletas mais freqüentes sem a estimulação hormonal (BROGLIATTI et al., 1999; MAJERUS, et al., 1999).

Desta forma, a produção de embriões por aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e fertilização *in vitro* pode ser uma alternativa para uma maior produção de embriões de vacas vivas, pois a aspiração de uma vaca doadora duas vezes por semana durante três meses, é possível produzir três vezes mais embriões do que por TE clássica realizada no mesmo período (PEIXER et al., 1997).

### **1.2.3 Seleção e classificação dos oócitos**

A qualidade morfológica dos oócitos está altamente relacionada com sua competência em evoluir para um embrião (HAZELEGER & STUBBINGS, 1992; HAWK & WALL, 1994; KHURANA & NIEMANN, 2000; WIT et al., 2000; WIT & KRUIP, 2001). Assim, após a recuperação dos oócitos, com o auxílio da lupa estereoscópica, faz-se a seleção, levando em consideração o número de camadas

de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do oócito (GONÇALVES et al., 2002).

Segundo Gonçalves et al. (2002) a classificação dos oócitos é realizada com escala de 1 a 4, sendo, Qualidade 1: *Cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade 2: *Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida. Qualidade 3: *Cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerando, vacuolizando ou fragmentando. Qualidade 4: Oócito desnudo sem *cumulus*.

Realizada a seleção, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em laboratório para produção de embriões, maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (GARCIA et al., 2004).

### 1.3 MATURAÇÃO *IN VITRO*

A maturação tem início logo após a remoção do oócito do interior do folículo ovariano. Em bovinos, são necessárias de 20 a 22 horas para que ocorra a maturação nuclear, com progressão do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II. Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (GARCIA et al., 2004).

Considerando que oócitos maturados *in vitro*, quando comparados aos *in vivo*, apresentam menores taxas de blastocistos após a fecundação e o cultivo *in vitro* (TAKAGI et al., 2001), pode-se supor que a maturação ainda continua sendo um problema na PIVE (DODE & RUMPF, 2002). Portanto, são necessários outros

estudos para entendimento dos mecanismos que ocorrem durante a retenção da meiose e a maturação oocitária (CORDEIRO, 2001).

#### **1.4 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

A fertilização é um processo complexo, que resulta da união de dois gametas, com restauração do número de cromossomos somáticos e, conseqüentemente, início do desenvolvimento de um novo indivíduo (GORDON, 1994).

Os espermatozóides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo *in vivo*, os espermatozóides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante foi denominada de capacitação espermática (CHANG, 1951; AUSTIN, 1951).

Portanto, para que ocorra a fecundação dos oócitos, os espermatozóides precisam estar previamente capacitados. Desta forma, adicionam-se agentes capacitores como a heparina e o cálcio ionóforo (YANG et al., 1993), sendo a heparina, a glicosaminoglicana mais utilizada para capacitar espermatozóides para a FIV (GONÇALVES et al., 2002).

No processo de fertilização *in vitro* são usados espermatozóides de palhetas de sêmen congelado. Em geral, a concentração de espermatozóides usada é de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL, sendo o número de doses calculado de acordo com a motilidade e a concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll. O período de incubação dos oócitos com os espermatozóides varia entre 6 e 20 horas (GARCIA et al., 2004).

## 1.5 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* corresponde a etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocela, sendo que no 7º dia é feita a seleção e a avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para congelamento (GARCIA et al., 2004).

## 1.6 SITUAÇÃO ATUAL DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Contrariando certo ceticismo inicial, a PIVE atualmente é uma biotécnica consolidada, com expressivo número de animais nascidos por este procedimento, particularmente no Brasil (SENEDA & BLASCHI, 2004).

A aspiração de oócitos imaturos diretamente de folículos ovarianos, associada à maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, permite que seja produzida, pelo menos, uma gestação por semana por doadora (PEIXER et al., 2000a,b; BOUSQUET et al., 2000).

A possibilidade de produção de bezerros de fêmeas de dois a três meses de idade também é de grande interesse, visto que o intervalo entre gerações pode ser significativamente reduzido, proporcionando ganho genético elevado do rebanho em um menor período de tempo (DODE & RUMPF, 2002). Desta forma, tem-se obtido embriões viáveis, gestações e bezerros nascidos, provenientes de oócitos de bezerras pré-púberes em diferentes idades (FRY et al., 1998; BROGLIATTI et al., 1999; MALARD, 2000; TANEJA et al., 2000).

Além disso, a capacidade de obtenção de embriões em situações de infertilidade extra-ovariana motivou vários grupos à realização do procedimento, tendo-se verificado o nascimento de diversos produtos (LOONEY et al., 1994; HASLER et al., 1995; BOLS et al., 1996; SENEDA et al., 2000).

Atualmente, os índices de gestação tem variado entre 20 e 60%, de acordo com o sistema de produção *in vitro* usado pelos diferentes laboratórios.

Dayan et al. (2000) constatou que cerca de 30 a 50% dos oócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 35%. No entanto, segundo Galli et al. (2001), as perdas durante o primeiro trimestre de gestação podem atingir 10 a 12%. Há vários relatos descritos na literatura de prolongamento da gestação, distocia, aumento de mortalidade pré-natal e de peso corpóreo, constituindo a denominada “Síndrome do Bezerro Grande” (Large Offspring Syndrome), (YOUNG et al., 1998).

Acredita-se que estes problemas estejam relacionados a altas concentrações de soro utilizadas no cultivo, visto que no cultivo *in vitro* de embriões de ovelhas sem o uso de altas concentrações de soro ou BSA, até 95% das gestações foram normais e a incidência desta “Síndrome” foi diminuída (GALLI et al., 2001; NUMABE et al., 2000; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; SANGILD et al., 2000).

Desta forma, a PIVE, tem sido utilizada em vários países do mundo com perspectivas promissoras, tendo viabilizado nascimento de expressivo número de produtos desde 1996 (GALLI & LAZZARI, 1996). No entanto, a permuta de informações acadêmicas é considerada etapa essencial para superação dos atuais entraves, tais como, redução dos custos de realização da técnica e problemas relacionados ao parto (SENEDA & BLASCHI, 2004).

É importante salientar também que, por se tratar de uma técnica relativamente nova, o monitoramento rigoroso das doadoras, dos oócitos coletados, dos embriões e dos produtos nascidos é de fundamental importância para que essa técnica possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais indicadas (DODE & RUMPF, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar a produção de oócitos, embriões e gestações de fêmeas Nelore submetidas à aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões.

Avaliar as taxas de gestação aos 30 e 60 dias e, conseqüentemente, a taxa de morte embrionária que ocorre nesse período.

### **3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

RUBIN, Karina Cristina Puggesi. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE)**. Londrina: UEL, 2006. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal).

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda**

### RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, e é também o maior produtor mundial de embriões produzidos *in vitro*, embora a principal raça nacional – Nelore – que é a mais explorada para PIVE, tenha suas particularidades reprodutivas pouco conhecidas. O objetivo deste estudo foi analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala. O estudo baseou-se numa análise de dados obtidos da Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda, no período de janeiro de 2001 a maio de 2006. Foram selecionadas 420 doadoras da raça Nelore, de alto valor genético, com idades variando de 2 a 8 anos (média de 5 anos), que foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia. As cinco doadoras de maior produção foram analisadas separadamente, a fim de se evidenciar o impacto dos animais de alta produção. Não houve estímulo hormonal em nenhuma das doadoras. Foi utilizado sêmen de 74 touros provenientes de centrais de colheita de sêmen. Ao final de 1504 aspirações, obteve-se 27966 oócitos, sendo 22809 (81,6%) viáveis e 5157 (18,4%) inviáveis. A média de oócitos viáveis por aspiração folicular foi de 15,2. Obtêve-se 7725 embriões e 2585 prenhez (1,7 prenhez/aspiração). Do total de prenhez obtido, subtraindo-se as mortes embrionárias, a eficiência foi de 29,9% (2312/7725), ou seja, 1,5 prenhez/aspiração. Os números obtidos contrastam com os da literatura para gado europeu, demonstrando uma eficiência no processo de produção de embriões *in vitro* muito superior para a raça Nelore – cerca de quatro vezes mais embriões. Tal aspecto deve-se a características fisiológicas pouco conhecidas desta raça. A partir desta constatação, serão propostas estratégias experimentais para elucidar os mecanismos envolvidos com a maior produção folicular e o melhor rendimento da raça Nelore no processo de produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** PIVE, embriões, oócitos, aspiração folicular, OPU



RUBIN, Karina Cristina Puggesi. **Reproductive peculiarities of Nelore breed in the embryos *in vitro* production (EIVP)**. Londrina: UEL, 2006. (Msc Dissertation).

**Adviser: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda**

### ABSTRACT

Brazil has the most commercial herd of cattle of the world, and is also in the first place among countries of the world in embryos *in vitro* production, though the main national breed – Nelore – has its unfamiliar peculiarities. The object of this study was to analyse the reproductive peculiarities of Nelore cows (*Bos taurus indicus*) on the large scale process of embryos *in vitro* production. The study analysed data obtained of the Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda, from January of 2001 to May of 2006. It was selected 420 Nelore donors, of high genetic value, with ages between 2 and 8 years (average 5 years), that were submitted to follicular aspiration guided by ultrasound. The five donors of higher production were analysed in separate to show the impact of the animals of high production. There was not hormonal stimulus in the donors. It was used semen from 74 bulls proceeding from semen collection centers. At the end of 1.504 aspirations, 27.966 oocytes were obtained, 22.809 of which (81,6%) were viable and 5.157 (18,4%) were not viable. The viable oocytes average obtained per follicular aspiration was 15,2. It was obtained 7725 embryos and 2585 pregnancies (1,7 pregnancies/aspiration). Considering the total of pregnancies obtained, and not considering the embryonic deaths, the efficiency was of 29,9% (2312/7725), in the other words, 1,5 pregnancies/aspirations. The numbers which were obtained contrast with the ones from the literature for *Bos Taurus*, showing an efficiency in the process of embryos *in vitro* production much higher for the Nelore breed – about four times more embryos. This aspect is due to physiological characteristics which are not much known considering this breed. From this fact on, experimental strategies will be proposed to elucidate the mechanisms involved with the biggest follicular production and the best performance of Nelore breed in the process of embryos *in vitro* production.

**Key words:** EIVP, embryos, oocytes, follicular aspiration, OPU

## Introdução

As fêmeas bovinas nascem com mais de 100.000 oócitos em seus ovários (GORDON, 2003). No entanto, pelas vias naturais, apenas 0,01% de produtos viáveis podem ser gerados, ou seja, um número próximo a dez descendentes em toda sua vida reprodutiva (BOLS, 1997).

Contrariando certo ceticismo inicial, a PIVE tem sido uma boa alternativa para o aproveitamento desta reserva, com expressivo número de animais nascidos por este procedimento, particularmente no Brasil (SENEDA & BLASCHI, 2004), país que apresenta o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 170 milhões de cabeças; das quais 80% zebuínos ou cruzados com zebu e 90 milhões destes da raça Nelore (NOGUEIRA, 2004).

O Brasil também é o primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro*. Este cenário nacional pode ser compreendido por algumas particularidades: a grande quantidade de laboratórios privados com domínio da PIVE, os altos preços alcançados por animais da raça Nelore e, estreitamente relacionado com esses dois aspectos, a elevada produção de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas desta raça.

Durante o ano de 2003, mais de 60.000 embriões foram gerados por esse método e aproximadamente 87.000 embriões pelo método *in vivo* (THIBIER, 2004). Apesar do expressivo número de embriões obtidos por lavagem uterina, verifica-se uma clara tendência no aumento de embriões produzidos *in vitro*.

Para fêmeas Nelore, pode-se admitir uma maior quantidade de embriões por procedimento com a PIVE, quando comparada à colheita e transferência de embriões (NONATO JR et al.; 2004). Vacas Nelore produzem, em média, 25 oócitos por sessão de aspiração folicular (RUBIN et al.; 2004). Esta média de oócitos por

sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias (RUBIN et al.; 2005). Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (SENEDA et al.; dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento (SANTOS et al.; 2005).

Ressalta-se que na literatura especializada há uma enorme carência de dados sobre as particularidades reprodutivas da raça Nelore, tanto de mecanismos fisiológicos, quanto dos aspectos aplicados das biotécnicas da reprodução. O objetivo do presente trabalho foi analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala para permitir uma melhor compreensão dos fatores que fizeram o Brasil tornar-se líder mundial nesta biotécnica.

## Material e Métodos

### Local

O estudo baseou-se numa análise de dados obtidos na Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda, situada no município de Mogi Mirim, Estado de São Paulo, no período de janeiro de 2001 a maio de 2006. Todos os animais eram parte do programa comercial de produção *in vitro* de embriões da empresa.

### Animais

Foram utilizadas doadoras da raça Nelore (n=420) de alto valor genético, livres de doenças infecciosas e reprodutivas, não gestantes, com idades variando de 2 a 8 anos (média de 5 anos). Das 420 doadoras, analisou-se separadamente as cinco de maior produção, a fim de se evidenciar o impacto dos animais de alta produção. Não houve estímulo hormonal em nenhuma das doadoras.

As receptoras utilizadas foram novilhas cruzadas, livres de doenças infecciosas e reprodutivas.

Foi realizado, em média, 3,6 aspirações foliculares/animal, sendo o mínimo de uma e o máximo de vinte e três em cada animal. No experimento utilizou-se sêmen congelado de 74 touros, provenientes de centrais de colheita de sêmen.

## Aspiração folicular

Antes de cada procedimento, esvaziava-se o reto dos animais e a higienização da região perineal era realizada com água corrente e álcool etílico 70° GL. Para redução dos movimentos peristálticos e o menor desconforto do animal, foram injetados 5 ml de lidocaína 2 % no espaço epidural.

O intervalo entre as aspirações não foi relatado porque as doadoras foram provenientes do programa comercial de produção *in vitro* de embriões da Central de Biotecnologia In Vitro Brasil, Ltda e, portanto, as aspirações foram realizadas de acordo com o interesse de cada proprietário, não havendo um intervalo regular.

Os procedimentos de aspiração folicular transvaginal (PIETERSE et al.; 1988) foram realizados com o auxílio de ultra-som 485 Anser (Pie Medical, Holanda) com transdutor setorial (convexo) de 7,5 MHz. O transdutor foi acoplado em dispositivo próprio para utilização transvaginal (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ltda., Brasil). Para aspiração dos folículos foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis 40 mm x 20 G (Becton Dickinson Ltda., Brasil) e mangueira de silicone com 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento. A pressão de vácuo era de 65 a 75 mm de Hg, mantida com uma bomba de aspiração (Cook, Nova Zelândia). O meio de aspiração constituía-se por DPBS (Nutricell, Brasil) acrescido de 20.000 UI/L de heparina sódica (Liquemine, Roche, Brasil), mantido à 30 °C durante a aspiração. Este mesmo meio foi utilizado para lavagem prévia do sistema para prevenir a coagulação de sangue. Após a visualização e avaliação numérica, os folículos foram aspirados de ambos ovários.

## Seleção dos oócitos

Imediatamente após a aspiração folicular, o material recuperado foi lavado em filtros para colheita de embriões (Em Com) com DPBS (Nutricell, Brasil), e depositado em placas de petri 90 mm x 15 mm (Inlab, Brasil). Os oócitos recuperados foram classificados, lavados em meio TCM 199 Hepes (Gibco, EUA) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Gibco, EUA), 22 µg/mL de piruvato, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Vetrepharm, Canadá), e 50 µg/mL de hormônio luteinizante (LH – APL, Bélgica), sendo então transferidos para criotubos de 2 mL (Corning/Coastar, EUA) onde permaneciam, durante o transporte até o laboratório, em incubadoras de transporte (Minitub, Alemanha) à 38 °C.

## Maturação *in vitro*

Os oócitos foram colocados em placas de petri 60 mm x 15 mm (Corning, EUA) em gotas de 100 µL de meio TCM 199 Bicarbonato (Gibco, EUA) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Gibco, EUA), 22 µg/mL de piruvato, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Vetrepharm, Canadá), e 50 µg/mL de LH (APL, Bélgica), recobertas com óleo mineral e mantidas à 38,8 °C em incubadoras (Thermo Forma, EUA) com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, durante 24 horas.

### Fecundação *in vitro*

Após a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos foram colocados em gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio Tyrodes, suplementado com 0,6 % de albumina sérica bovina (BSA - Fraction V, Sigma, EUA), 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina, 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de piruvato, e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina (PARRISH et al.; 1986). A heparina é utilizada para capacitar os espermatozoides bovinos, através de mudanças bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide. Palhetas contendo sêmen foram descongeladas por 20 segundos em água aquecida à 35 °C, depositadas em tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 900g por 30 minutos através de um gradiente de Percoll 45-90% (Sigma, EUA). Após a centrifugação o sêmen foi diluído para  $2 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL em meio Fert Talp e adicionado às gotas de fecundação, a 38,8 °C e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, por 20 a 22 horas.

### Cultivo *in vitro*

Após a fecundação *in vitro* (FIV), os prováveis zigotos e as células do *cumulus* foram transferidos para gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura de embriões, um fluido de oviduto sintético modificado SOFaa BSA (TERVIT et al.; 1972), contendo 8 mg/mL de BSA (Sigma, EUA) livre de ácido graxo e 1 mM de glutamina, nas mesmas condições da FIV, permanecendo por 5 a 8 dias neste meio. A osmolaridade foi mantida em 270 – 280 mOsmol e o pH em 7,4. A taxa de desenvolvimento foi considerada pelo número de embriões obtidos a partir do total de oócitos maturados.

## Transferência dos embriões

Os embriões obtidos foram transferidos a receptoras cruzadas, livres de doenças infecciosas e reprodutivas, previamente sincronizadas através da aplicação de 500 mg de cloprostenol sódico (Ciosin, Coopers, Brasil), em dose única, administrada dois dias antes da aspiração folicular. Os embriões foram transferidos através de inovulação transcervical no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo.

Foram transferidos embriões nos estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. Em relação ao estágio embrionário dos embriões produzidos, foram analisadas as taxas de prenhez e eficiência obtida.

Diagnóstico de gestação, avaliação da morte embrionária e identificação do sexo fetal

O diagnóstico precoce de gestação e a identificação do sexo fetal foram realizados com o auxílio de ultra-som 485 Anser (Pie Medical, Holanda), utilizando-se transdutor linear de 5,0 MHz. De acordo com a localização do tubérculo genital foi verificado o sexo fetal. Buscava-se uma imagem ventral do feto, quando o tubérculo genital era visualizado próximo ao umbigo, o feto era identificado como do sexo masculino e quando localizava-se próximo à cauda, era identificado como do sexo feminino. O diagnóstico precoce era realizado aos 30 dias de gestação e o sexo dos fetos era conhecido nas gestações confirmadas aos 60 dias. A morte embrionária foi calculada pela diferença de percentual entre as taxas de gestação com 30 e 60 dias.



## Resultados

Foram coletados 27966 oócitos de 420 fêmeas em 1504 sessões de aspiração folicular. Do total de oócitos coletados, 22809 eram viáveis e 5157 inviáveis, média de 15,2 oócitos viáveis/aspiração. O número de embriões obtido foi de 7725, média de 5,1 embriões/aspiração, o que resultou em 2585 prenhez aos 30 dias, média de 1,7 prenhez/aspiração. Subtraindo as mortes embrionárias, obteve-se 2312 prenhez aos 60 dias – eficiência – ou seja, 1,5 prenhez/aspiração (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de oócitos, embriões e prenhez obtidos a partir de vacas Nelore submetidas à aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006.

	Oócitos	(%)	Embriões	(%)	Prenhez	(%)	M.E.	(%)	Eficiência	(%)
Viáveis	22809	81,6	7725	33,9	2585	33,5	273	10,6	2312	29,9
Inviáveis	5157	18,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	27966	100,0	7725	33,9	2585	33,5	273	10,6	2312	29,9

(M.E.: Morte Embrionária)

O diagnóstico precoce de gestação foi realizado aos 30 dias de gestação e o sexo dos fetos era conhecido nas gestações confirmadas aos 60 dias. O número encontrado foi de 1059 machos, 996 fêmeas e 257 não sexados. A diferença entre as taxas de gestação aos 30 e 60 dias retrata a morte embrionária que foi de 273 (Tabela 2).

Tabela 2. Proporção de fetos machos, fêmeas, não sexados e as perdas de gestação obtidas a partir de embriões Nelore produzidos por aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006.

	<i>Quantidade</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
Machos	1059	41,0
Fêmeas	996	38,5
Não sexados	257	9,9
Morte embrionária	273	10,6
Total	2585	100,0

Dos embriões obtidos, 500 foram provenientes de mórulas (MO), 869 de blastocistos iniciais (BI), 1821 de blastocistos (BL), 4519 de blastocistos expandidos (BX), 3 de blastocistos em eclosão (BN) e 13 blastocistos eclodidos (BE). Deste total, 10 embriões foram estocados e o restante foi transferido. A porcentagem de prenhez aos 30 dias e a eficiência obtida em relação ao estágio embrionário dos embriões encontra-se na Tabela 3. A eficiência foi calculada subtraindo-se o total de mortes embrionárias do número de prenhez aos 30 dias (Tabela 3). Considerando-se as mortes embrionárias, o resultado final foi de 1,5 prenhez/aspiração.

Tabela 3. Porcentagem de prenhez e eficiência obtida em relação ao estágio embrionário dos embriões produzidos *in vitro*, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006.

	<i>Embriões</i>	<i>(%)</i>	<i>Transferidos</i>	<i>Estoque</i>	<i>Prenhez</i>	<i>(%)</i>	<i>Eficiência</i>	<i>(%)</i>
MO	500	6,5	499	1	139	27,9	123	24,7
BI	869	11,3	869	-	247	28,4	221	25,5
BL	1821	23,6	1818	3	612	33,7	542	29,8
BX	4519	58,5	4513	6	1581	35,0	1421	31,5
BN	3	0,04	3	-	2	66,7	2	66,7
BE	13	0,2	13	-	4	30,8	3	23,1
Total	7725	100,0	7715	10	2585	33,5	2312	30,0

MO: Mórula; BI: Blastocisto Inicial; BL: Blastocisto; BX: Blastocisto Expandido; BN: Blastocisto em Eclosão; BE: Blastocisto Eclodido

Das 420 fêmeas foram selecionadas as cinco de maior produção para análise separadamente. Nestas vacas foi realizado, em média, 15 sessões de aspiração folicular/animal, sendo o mínimo de 10 e o máximo de 23; obtendo-se 2869 oócitos, com 2372 viáveis e 497 inviáveis, média de 31,6 oócitos viáveis/aspiração. Foi utilizado sêmen congelado de 17 touros provenientes de centrais de colheita de sêmen. O total de embriões produzidos foi de 1004, resultando em 438 prenhezes, obtendo-se média de 5,8 prenhezes/aspiração. As mortes embrionárias totalizaram 53 (Tabela 4). Subtraindo as mortes embrionárias, o resultado final obtido foi de 5,1 prenhezes/aspiração.

Tabela 4. Produção de oócitos, embriões, prenhez e eficiência das melhores doadoras Nelore submetidas à aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Central In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, 2006.

	Oócitos	(%)	Embriões	(%)	Prenhez	(%)	M.E.	(%)	Eficiência	(%)
Viáveis	2372	82,7	1004	42,3	438	43,6	53	12,1	385	38,3
Inviáveis	497	17,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	2869	100,0	1004	42,3	438	43,6	53	12,1	385	38,3

(M.E.: Morte Embrionária)

## Discussão

Apesar de a subespécie *Bos taurus indicus* (*B. indicus*) ser a mais tardia e atingir a puberdade somente aos 19,9 a 28,7 meses de idade (SILVA & ROMANO, 1991; RESTLE et al.; 1999; RODRIGUES et al.; 1999) e de sua grande importância econômica e social, especialmente nos trópicos, a literatura apresenta poucos estudos sobre esses animais (MACLELLAN et al., 1998; BROGLIATTI et al., 1999; MALARD, 2000; RUBIN et al., 2004; RUBIN et al., 2005; NONATO Jr., 2005). Os demais trabalhos utilizam *Bos taurus taurus* (*B. taurus*) principalmente as raças Holandesas e Simental.

Segundo Thibier (2004), em um relato de dados de comunicação pessoal citados por colegas brasileiros, em 2003 o Brasil realizou 11000 procedimentos de aspiração folicular, recuperando 267000 oócitos, com média de 25 oócitos por sessão de aspiração folicular. A produção mundial de embriões atingiu 106220 embriões, sendo que destes, 60000 (56,5%) foram produzidos no Brasil. No entanto, estas médias de oócitos não foram obtidas por uma análise específica, mas por estimativa global de procedimentos. Neste estudo, a aspiração folicular guiada por ultra-sonografia para produção *in vitro* de embriões bovinos da raça Nelore apresentou média de 18,6 oócitos por sessão de aspiração. Rubin et al. (2005) relataram que para animais *Bos taurus* da raça Aquitânica obteve-se média por sessão de aspiração de 3,7 oócitos aspirados; para animais da raça Canchim a média foi de 13,6 oócitos aspirados e na raça Nelore obteve-se média de 18,4 oócitos aspirados, tornando-se evidente que ao aumentarmos a porcentagem de sangue Nelore na constituição racial, há também um incremento na produção de oócitos, visto que a maior média de oócitos aspirados foi encontrada nas fêmeas da

raça Nelore e a segunda maior média nas fêmeas da raça Canchim que contém em sua constituição racial 5/8 de sangue Charolês e 3/8 de sangue Nelore. Finalmente, a menor média foi encontrada nas fêmeas da raça Aquitânica, que não apresentam sangue Nelore em sua constituição racial.

Estes dados estão de acordo com os citados na literatura. Utilizando fêmeas da raça Nelore, Blaschi et al. (2004) relataram média de 18,4 oócitos por sessão de aspiração folicular; Rubin et al. (2004) relataram média de 24,1 oócitos por sessão e Nonato Jr. (2005) utilizando 30 fêmeas da mesma raça obteve média de 25,7 oócitos por sessão de aspiração. Deve-se ressaltar que todos os trabalhos citados relataram um número bem menor de animais. Como demonstrado no presente estudo, alguns animais apresentam médias de produção de oócitos muito superiores. Assim, destacamos a importância de se analisar um número bem amplo de doadoras de oócitos para diminuir o efeito da variação individual.

Quanto aos dados da literatura para raças taurinas, Hasler et al. (1995) encontraram média de 4,9 oócitos por sessão de aspiração em vacas *Bos taurus*, semelhante ao resultado obtido por Rubin et al. (2005) em fêmeas da raça Aquitânica (3,7 oócitos por sessão de aspiração) e Looney et al. (1994) que relataram média de 6,3 oócitos por sessão em fêmeas *Bos taurus*.

Esta diferença entre a quantidade de oócitos recuperados nas fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, ocorre devido ao fato dos animais *Bos indicus* apresentarem maior quantidade de folículos em seus ovários, permitindo maior recuperação de oócitos.

Em relação aos oócitos viáveis, neste trabalho, a média foi de 15,2 (81,6%) oócitos viáveis por sessão de aspiração, enquanto que Nonato Jr. (2005) utilizando fêmeas Nelore e Hasler et al. (1995) utilizando fêmeas *Bos taurus* obtiveram média de

22,9 (89,1%) e 4,1 (83,7%) oócitos viáveis por sessão de aspiração folicular, respectivamente. Portanto, em relação aos valores percentuais, o parâmetro – oócitos viáveis – encontrado está de acordo aos citados trabalhos.

A média de embriões produzidos foi de 5,1 por sessão de aspiração folicular. Viana et al. (2004) utilizando vacas *Bos indicus* da raça Gir conseguiram resultados semelhantes, com média de 7,8 embriões viáveis/aspiração, embora tenham trabalhado com número muito menor de animais. Hasler et al. (1995), utilizando vacas *Bos taurus* obtiveram média bem inferior, de 0,72 embriões por aspiração folicular.

Aos 30 dias de gestação, 2585 dos 7725 embriões produzidos foram confirmados gestantes, representando uma taxa de gestação de 33,5%, semelhante à encontrada por Nonato Jr. (2005) e Dayan et al. (2000) que foram de 37,5 % e 35%, respectivamente. No entanto, segundo Bousquet et al. (1999) a taxa de gestação aos 30 dias, para embriões *Bos taurus*, foi de 53,4%. Este alto valor para taxa de gestação aos 30 dias para embriões *Bos taurus* pode ser justificado pela maior qualidade das receptoras, fato comum nas centrais da América do Norte e Europa. Como nestas fêmeas há uma menor recuperação de oócitos, conseqüentemente, menor produção de embriões, pode se fazer uma seleção das receptoras de melhor qualidade. Por outro lado, para as fêmeas *Bos indicus*, a elevada produção de oócitos, resulta numa elevada produção de embriões e devido à escassez de receptoras e a dificuldade de congelação dos embriões, utilizam-se todas as receptoras disponíveis. Assim, os menores índices nacionais de gestação após TE dos embriões produzidos *in vitro*, quando comparados com dados de outros países poderiam ser explicados por esta diferença operacional.

As mortes embrionárias que ocorreram entre os 30 e 60 dias de gestação – 10,6% - foram semelhantes a outros trabalhos, tanto com vacas Nelore quanto taurinas. Nonato Jr. (2005) relatou o mesmo valor com fêmeas Nelore e Bousquet et al. (1999) relataram 9,6% de mortes embrionárias para embriões *Bos taurus* produzidos *in vitro*. A taxa de gestação aos 60 dias foi de 29,9% (2312/7725). Em outro estudo, Farin & Farin (1995) relataram taxa de gestação aos 60 dias de 37% com animais *Bos taurus* e Nonato Jr. (2005) de 33,5% com animais *Bos indicus*.

A proporção macho-fêmea não foi analisada porque em algumas doadoras o sêmen utilizado era sexado.

Em relação ao estágio embrionário dos embriões transferidos, foram analisadas as mórulas, blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos, sendo que as porcentagens de prenhez e eficiência foram semelhantes em todos os estágios, o que facilita o manejo das receptoras, visto que o grande entrave da PIVE é o custo da preparação e disponibilidade destas fêmeas, devido à incerteza de quantos embriões poderão ser transferidos. Portanto, a transferência dos embriões pode ser realizada de acordo com a disponibilidade das receptoras, sendo possível transferir embriões em estágios iniciais como mórulas e blastocistos iniciais e também embriões mais desenvolvidos como no estágio de blastocisto eclodido, sem prejuízos na taxa de prenhez e eficiência.

As cinco doadoras selecionadas para análise separadamente obtiveram média de oócitos recuperados, embriões produzidos e prenhezes confirmadas muito acima da média dos outros animais do experimento; demonstrando que há uma diferença individual entre as fêmeas da raça Nelore quanto a produção de oócitos. Nestas cinco doadoras selecionadas, assim como nas outras doadoras do



experimento, não houve estímulo hormonal. Segundo Viana (2002), há uma grande variação entre doadoras, não associada à raça, condição corporal, manejo ou qualquer outra causa aparente, e esta tem sido a principal fonte de variação nos resultados da punção folicular.

Nestas fêmeas de elevada produção de oócitos, justifica-se a utilização de espermatozoides sexados, visto que, com uma dose inseminante sexada seria possível produzir várias gestações. Portanto, verdadeiras linhas de produção de embriões poderiam ser montadas para a produção de fêmeas, machos e animais de alto valor genético (DODE & RUMPF, 2002).

Desta forma, a crescente valorização da raça Nelore justifica-se pelo fato da recuperação de oócitos nestas fêmeas ser maior do que nas fêmeas *Bos taurus*, resultando numa maior produção de embriões e prenhezes por sessão de aspiração folicular; minimizando custos e o tempo consumido para executar a rotina de produção de embriões.

Três hipóteses principais são propostas para o fato desta maior produção de oócitos nas fêmeas Nelore. A primeira seria o maior número de oócitos obtidos *in vivo* de fêmeas da raça Nelore advir de uma maior população de folículos pré-antrais, em comparação com fêmeas *Bos taurus*. A segunda seria o maior número de oócitos obtidos *in vivo* de fêmeas da raça Nelore advir da renovação folicular pós-natal a partir de células germinativas presentes nos ovários. E a terceira seria o período da multiplicação de células germinativas ocorrendo de forma diferenciada para fêmeas *Bos taurus* e Nelore, ou seja, o término da multiplicação de células germinativas ocorrendo posteriormente em fêmeas Nelore, explicando o maior número de oócitos e folículos obtidos nesses animais.

## Referências Bibliográficas

BLASCHI, W.; ANDRADE, E.R.; NONATO Jr., I.; PONTES, J.H.F; ERENO Jr., J.C.; UVO, S.; SENEDA, M.M. Utilização prévia do Pluset na aspiração folicular: Impacto na produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.186, 2004.

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

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

BROGLIATTI, G.M.; FURNUS, C.C.; De MATOS, D.G.; MARTINEZ, A.G. *In vitro* fertilization program in prepuberal Brangus calves and later embryo collection. **Theriogenology**, v.51, n. 1, p. 313, 1999.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 181 – 185, 2000. Suplemento.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.

FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 676-682, 1995.

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

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, 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**, v. 43, p. 141 – 152, 1995.

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

MACLELLAN, L.J.; WHYTE, T.R.; MURRAY, A.; FITZPATRICK, L.A.; EARL, C.R.; ASPDEN, W.J.; KINDER, J.E.; GROTTJAN, H.E.; WALSH, J.; TRIGG, T.E.; D'OCCHIO, M.J. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) calves: effects of treatment with GnRH agonist or antagonist. **Theriogenology**, v. 49, n.7, p.1317 – 1329, 1998.

MALARD, P.F. **Coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade**. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG: UFMG, 47p.– 2000.

NOGUEIRA, G.P. Puberdade e maturidade sexual de novilhas *Bos indicus*. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 180- 190, 2004.

NONATO JR, I. **Produção de embriões em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) com a associação dos métodos *in vivo* e *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 50, 2005.

NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.95, 2004.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIEDGE-RUTHEDGE, M.L., CRITSER E.S., EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.

PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751 – 762, 1988.

RESTLE, J.; POLLI, V.A.; SENNA, D.B. Efeito do grupo genético e heterose sobre a idade e peso a puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.4, p.701 – 707, 1999.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Treatment with 17beta-oestradiol does not influence age and weight at puberty in *Bos indicus* heifers. **Animal Reproduction Science**, v.56, n. 1, p.1 – 10, 1999.

RUBIN, K.C.P; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P; MARQUES, M.O.; SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004.

RUBIN, K.C.P; PONTES, J.H.F.; NONATO JR., ERENO JR., J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005.

SANTOS, R.G.; SOTO, M.A.B.; LOURENÇO, R.X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.; ACCORSI, M.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal [**Anais...**], v.16, p. 79, 2005.

SENEDA, M.M.; BLASCHI, W. *Ovum* pick up em bovinos: considerações técnicas. *In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 231- 237, 2004.

SILVA, A.E.D.F.; ROMANO, M.A. Alguns aspectos de puberdade maturidade de fêmeas da raça Canchim, Nelore, e meio-sangue Canchim e Nelore. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 9, 1991, Belo Horizonte. [Anais...] Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.2, p.381, 1991.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal Reproduction Fertility**, v. 30, p. 493-7, 1972.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12 - 19, 2004.

VIANA, J.H.M.; ARASHIRO, E.K.N.; FREITAS, C.; PALHÃO, M.P.; FONSECA, J.F. Associação entre as técnicas de punção folicular e colheita de embriões em vacas Gir. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 32, n.1, p. 193, 2004. (Resumo).

VIANA, J.H.M. Punção folicular em bovinos da raça Gir. *In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.

## 4 Conclusão

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

◆ Vacas Nelore submetidas à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e fertilização *in vitro* produziram um maior número de oócitos, embriões e prenhezes em comparação aos relatos da literatura com vacas *Bos taurus* submetidas ao mesmo processo.

◆ A porcentagem de morte embrionária foi semelhante aos relatados na literatura para fêmeas Nelore e fêmeas *Bos taurus*.

◆ Entre as fêmeas bovinas da raça Nelore, há diferença individual na produção de oócitos.

## REFERÊNCIAS

ADAYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.14, p. 422 - 420, 1980.

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, v 4, n.1, p. 581 – 596, 1951.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677 – 687, 1995.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on *cumulus* oocyte complex morphology and development capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001 – 1014, 1996.

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

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

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; DUROCHER, J.; BARNES, F.L.; SIRARD, M.A. Effect of LH injection before ovum pick up on *in vitro* embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. **Theriogenology**, v.53, p. 347, 2000.

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

BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v.45, p. 1163-1176, 1996.

BROGLIATTI, G.M.; FURNUS, C.C.; De MATOS, D.G.; MARTINEZ, A.G. *In vitro* fertilization program in prepubertal Brangus calves and later embryo collection. **Theriogenology**, v.51, n. 1, p. 313, 1999.

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**, v.63, p.1249 - 1255, 2005.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. **Nature**, v. 168, n.1, p. 697 – 698, 1951.

CORDEIRO, D. **Estabelecimento da técnica de análise de proteoma de complexos cumulus ovócitos bovinos bloqueados ou não com 6-dimetilaminopurina durante a maturação *in vitro***. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 105p, 2001.

DAYAN, A. Utilização das técnicas de aspiração folicular e fecundação *in vitro* na reprodução bovina. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 181 – 185, 2000. Suplemento.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.

FRIES, L.A. Perspectivas da pecuária brasileira dentro do contexto mundial. In: IV Simpósio: O Nelore do Século XXI, 1997, Uberaba, MG, [Anais...], p. 188, 1997.

FRY, R.C.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1077 – 1082, 1998.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341 – 1357, 2001.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371 – 379, 1996.



GARCIA, J.M.; YAMASAKI, W.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; SENEDA, M.M.; ESPER, C.R. Produção *in vitro* de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p. 60 – 64, 2003.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. *In*: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 223- 230, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 340p., 2002.

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

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. *In*: Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Wallingford. Oxon. UK., p.30 - 142, 1994.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, 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**, v. 43, p. 141 – 152, 1995.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v. 41, p. 1571 – 1583, 1994.

HAZELEGER, N.L.; STUBBINGS, R.B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 219, 1992.

HOESCHELE, I. Potential gain from insertion of major genes into dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2601 – 2618, 1990.

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

KRUIP, T.A.M.; PIETERSE, M.C.; VAN BENEDEN, T.H.; VOS, P.L.A.M.; WURTH, Y.A.; TAVERNE, M.A.M. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. **Veterinary Record**, v.128, p. 208 – 210, 1991.

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

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p.741 – 756, 2000.

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

LU, K.H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Record**, v.121, p. 159 – 260, 1987.

MAJERUS, V.; De ROOVER, R.; ETIENNE, D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology**, v. 52, n.7, p. 1169-1179, 1999.

MALARD, P.F. **Coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade**. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG: UFMG, 47p.– 2000.

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**, v.73, p. 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 cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

NOGUEIRA, G.P. Puberdade e maturidade sexual de novilhas *Bos indicus*. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 180- 190, 2004.

NONATO JR, I. **Produção de embriões em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) com a associação dos métodos *in vivo* e *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 50, 2005.

NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.95, 2004.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth – weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of *in vitro* or *in vivo* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.13 – 20, 2000.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Workshop sobre Reprodução Animal, I, 2000, Pelotas: [Anais...] Embrapa Clima Temperado, p. 95 – 99, 2000a.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões – visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 175, 2000b. Suplemento.

PEIXER, M.A.S.; RUMPF, R.; De BEM, A.R.; QUIROZ, L.M.V. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 1997.

PEREZ, O.; RICHARD, I.R.; GREEN, H.I.; YOUNGS, C.R.; GODKE, R.A. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated post-partum beef cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 364, 2000.

PESSUTI, O.; MEZZADRI, F.P. Atualidade e perspectivas da pecuária paranaense. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 1- 8, 2004.

PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751 – 762, 1988.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, T.H.; WILLEENSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 19 – 24, 1991.

REICHENBACH, H. D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.31, n.1, p.15, 2003.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p. 186-187, 2000.

RUBIN, K.C.P; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P; MARQUES, M.O.; SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004.

RUBIN, K.C.P; PONTES, J.H.F.; NONATO JR., ERENO JR., J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005.

SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H.; FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.; AVERY, B.; GREVE, T. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1495 – 1504, 2000.

SANTOS, R.G.; SOTO, M.A.B.; LOURENÇO, R.X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.; ACCORSI, M.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal [**Anais...**], 16, p. 79, 2005.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382 - 2394, 2005.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. In: XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, [**Anais ...**] v. 26, n. 1, p. 141-145, 1998.

SENEDA, M.M.; BLASCHI, W. *Ovum pick up* em bovinos: considerações técnicas. *In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 1, 2004, Londrina, PR. [Anais...] São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, p. 231- 237, 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**, v.28, n.1, p.331, 2000.

STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 705 – 712, 1995.

TAKAGI, M.; KIM, I.H.; IZADYAR, F.; HYTTEL, P.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. **Reproduction**, v. 121, p. 941 – 951, 2001.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M.W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206 – 213, 2000.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-19, 2004.

WATANABE, Y.F. **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após maturação e fecundação *in vitro* com sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus***. Dissertação (Mestrado), FCAVJ – UNESP, Jaboticabal, 131p., 1993.

WIT, A.A.C; KRUIP, T.A.M. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v.65, n. 1-2, p.51 – 65, 2001.

WIT, A.A.C; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A.M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte-complex. **Journal Animal Science**, v.78, n. 5, p.1277 – 1283, 2000.

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

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155 – 163, 1998.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.W.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 575 – 597, 2000.

VIANA, J.H.M. Punção folicular em bovinos da raça Gir. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [**Anais...**] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.