



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

KOLOWYSKYS SILVA DE ALENCAR DANTAS

**FATORES QUE INFLUENCIAM OS RESULTADOS DE UM PROGRAMA DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS LEITEIROS NO NORDESTE DO
BRASIL**

FORTALEZA – CEARÁ

2018

KOLOWYSKYS SILVA DE ALENCAR DANTAS

FATORES QUE INFLUENCIAM OS RESULTADOS DE UM PROGRAMA DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS LEITEIROS NO NORDESTE DO
BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Cabral Campello.

FORTALEZA – CEARÁ

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas**

Dantas, Kolowyskys Silva de Alencar.

Fatores que influenciam ao resultados de um programa de transferência de embriões em bovinos leiteiros no Nordeste do Brasil [recurso eletrônico] / Kolowyskys Silva de Alencar Dantas. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 $\frac{3}{4}$ pol.

CD-ROM contendo o arquivo em formato PDF do trabalho acadêmico com 65 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2016.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientação: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Coorientação: Prof. Dr. Claudio Cabral Campello.

1. Bovino. 2. Receptora. 3. Embrião. 4. PIVE. I. Título.

KOLOWYSKYS SILVA DE ALENCAR DANTAS

FATORES QUE INFLUENCIAM OS RESULTADOS DE UM PROGRAMA DE
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS LEITEIROS NO NORDESTE DO
BRASIL

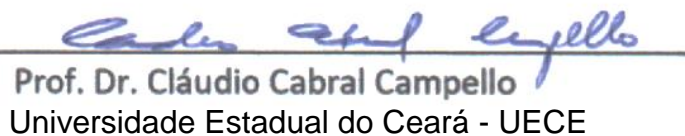
Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Profissional em Biotecnologia
em Saúde Humana e Animal da
Faculdade de Veterinária da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito parcial
à obtenção do título de mestre em
Biotecnologia.

Aprovada em: 06 de abril de 2018.

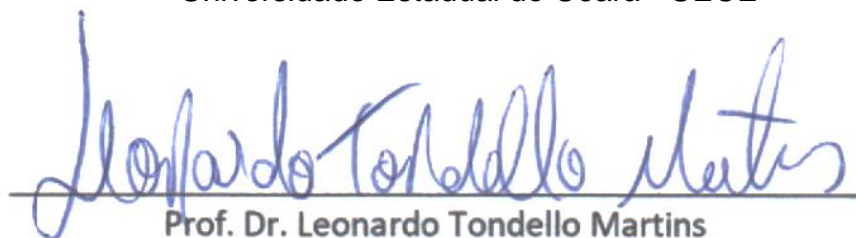
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Ferreira Nunes (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Prof. Dr. Leonardo Tondello Martins

Universidade Estadual do Ceará - UECE

À memória de meu pai, Lindolfo Dantas.
Às mães Dinha e Elenice.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradecimento primordial não poderia deixar de ser Àquele que me permitiu sonhar de uma forma que alargasse meus horizontes. Sonhei, busquei e conquistei, mas, antes, o sonho foi plantado em mim. Obrigado ao Deus que semeou.

Aos meus pais, à minha esposa Cláudia, aos meus filhos Raissa e Raul, que compartilharam os nossos ideais e os alimentaram, incentivando-nos a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos; tantas foram as vezes que o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês, em uma união que me incentivava a prosseguir. Hoje, procuro entre as palavras aquela que gostaria que seus corações ouvissem, e só encontro uma simples e sincera: obrigado.

A todos os colaboradores das propriedades onde o trabalho foi desenvolvido, que sempre estiveram solícitos às nossas demandas, sempre me incentivando, e demonstrando uma alegria atípica para as adversidades que passávamos.

Ao meu orientador, Dr. Nunes, de quem desfruto da amizade e do prazer de ser orientado desde a graduação, e que sempre me repassou ensinamentos importantes não só para a pesquisa, mas para a vida.

E, por fim, pois não tenho palavras suficientes para agradecer e definir o papel dessa pessoa na minha vida, ao professor Cláudio Cabral, meu IRMÃO de longas batalhas, e que NUNCA me negou NADA, tanto na vida pessoal quanto profissional, e a quem devo praticamente tudo o que sou hoje.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

“Estude, enquanto eles dormem.
Trabalhe, enquanto eles se divertem.
Lute, enquanto eles descansam.
Depois viva o que eles sempre
sonharam.”

(autor desconhecido)

RESUMO

A pecuária bovina brasileira tem se mostrado altamente sofisticada, com avanços tecnológicos nas áreas de reprodução e utilização de biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), gerando benefícios econômicos aos criadores. O estudo objetivou avaliar a viabilidade técnica da inclusão de matrizes como receptoras em programas de transferência de embriões a partir da detecção de folículos maduros nos exames preliminares. O estudo foi desenvolvido em duas propriedades do Nordeste do Brasil voltadas à pecuária leiteira (CE e RN). Foram utilizadas 1.015 vacas receptoras, das raças Girolando, Gir leiteiro e Nelore, sendo parte delas lactantes e outras secas, além de nulíparas. Tais receptoras estavam sob regime semiextensivo, onde parte delas (lactantes) permanecia em confinamento e o restante (secas) em regime de pasto (*Panicum* spp.) e sal mineral à vontade. No rebanho experimental foram realizadas: (a) avaliação ginecológica e seleção de possíveis receptoras; (b) resposta das receptoras ao protocolo de sincronização do estro (presença de corpo lúteo – CL); (c) diagnóstico de gestação; e (d) avaliação do número de gestações que vieram a termo. Foram registrados dados referentes ao *status* reprodutivo de cada uma das matrizes avaliadas em três momentos: (1) avaliação preliminar - exame ginecológico realizado em todas as fêmeas disponíveis para a seleção de receptoras; (2) confirmação do sucesso da implantação do embrião, representado pela continuidade da gestação (60 dias após o procedimento de inovulação); e (3) resultado final da gestação, na forma de parto a termo ou perda fetal. Registraram-se também dados referentes ao estágio de desenvolvimento do embrião selecionado para inovulação, nas categorias: mórula, blastocisto inicial, blastocisto tipicamente caracterizado, e blastocisto expandido. Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, foi observado que: matrizes que apresentam folículos maduros na ausência de CL, no exame ginecológico preliminar, podem apresentar resultados equivalentes aos daquelas admitidas pela presença de CL; com relação ao resultado final das TE, não houve diferença entre os ovários em que os folículos ou CL foram encontrados; embriões em estágios de blastocisto devem ser prioritariamente selecionados para transferência, uma vez que apresentam maiores índices de nidação e desenvolvimento de prenhez. Diante dos resultados, ressalta-se que o critério de seleção de receptoras proposto possibilita

uma ampliação de aproximadamente 10% no número de fêmeas aproveitáveis para um programa de TE, podendo se tornar um procedimento importante na viabilização econômica dessa biotécnica, uma vez que o pequeno número de receptoras aptas é considerado uma das principais causas da dificuldade de diluição dos custos fixos associados aos programas de TE em rebanhos leiteiros.

Palavras-chave: Bovino. Receptora. Embrião. PIVE.

ABSTRACT

Brazilian cattle breeding has been highly sophisticated, with technological advances in the areas of breeding and use of biotechnology, such as artificial insemination at fixed time (AIFT), embryo transfer (ET) and *in vitro* embryo production (IVEP), generating economic benefits for breeders. The objective of this study was to evaluate the technical viability of the inclusion of matrices as receptors in embryo transfer programs from the detection of mature follicles in preliminary examinations. The study was developed in two properties in the Northeast of Brazil focused on dairy cattle raising (CE and RN States). A total of 1,015 cows were collected from the Girolando, Gir dairy and Nellore breeds, and some of them were lactating and other droughts, as well as nulliparous. These receptors were under a semi-extensive regime, where part of them (lactating) remained in confinement and the rest (empty) under pasture (*Panicum* spp.) and mineral salt freely. In the experimental cattle were performed: (a) gynecological evaluation and selection of possible recipients; (b) response of the recipients to the estrus synchronization protocol (presence of corpus luteum - CL); (c) diagnosis of gestation; and (d) evaluation of the number of pregnancies that have come to term. Data regarding the reproductive status of each of the matrices evaluated at three moments were recorded: (1) preliminary evaluation - gynecological examination performed on all females available for selection of recipients; (2) confirming the success of the embryo implantation, represented by the continuity of gestation (60 days after the innovation procedure); and (3) the end result of gestation, in the form of term delivery or fetal loss. Data on the stage of embryo development selected for innovation were also recorded, in the categories: morula, initial blastocyst, typically characterized blastocyst, and expanded blastocyst. Under the conditions in which the present study was carried out, it was observed that: matrices that present mature follicles in the absence of LC, in the preliminary gynecological examination, can present results equivalent to those admitted by the presence of LC; with respect to the final result of the TE, there was no difference between the ovaries in which the follicles or CL were found; embryos in stages of blastocyst should be selected for transfer as a priority, since they present higher nesting rates and development of pregnancy. In view of the results, it is pointed out that the proposed criterion of selection of recipients allows a magnification of approximately 10% in the number of females that can be used for an ET program,

and may become an important procedure in the economic viability of this biotechnology, since small number of fit recipients is considered to be one of the main causes of the difficulty of diluting the fixed costs associated with ET programs in dairy herds.

Keywords: Bovine. Receptor. Embryo. IVEP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Vista aérea da Fazenda São José, em Tabuleiro do Norte, Ceará.....	42
Figura 2 -	Entrada da Fazenda São José, em Tabuleiro do Norte, Ceará.....	43
Figura 3 -	Vista aérea da Fazenda Nova, em Major Sales, Rio Grande do Norte.....	44
Figura 4 -	Realização de exame ginecológico por palpação retal com auxílio de ultrassonografia.....	45
Figura 5 -	Registro fotográfico de vaca doadora de embriões da raça Gir.....	46
Figura 6 -	Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom.....	46
Figura 7 -	Escritório da fazenda com sistema informatizado.....	47
Figura 8 -	Procedimento de inovulação em vacas.....	49
Figura 9 -	Bezerras oriundas de produção “in vitro” de embriões.....	50
Figura 10 -	Resultados do primeiro exame para diagnóstico de gestação após a transferência de embriões, a partir de estruturas em diferentes fases de desenvolvimento.....	57
Figura 11 -	Percentuais de partos a termos obtidos a partir de inovulações com embriões de diferentes estádios de desenvolvimento.....	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percentual de aproveitamento de matrizes para o programa de transferência de embriões de acordo com o tipo de estrutura encontrada no exame ginecológico preliminar (corpo lúteo ou folículo) e o lado em que o ovário estava localizado (direito ou esquerdo)..... 52**
- Tabela 2 - Percentual de matrizes apresentando resultado positivo de gestação por transferência de embriões de acordo com o tipo de estrutura encontrada no exame ginecológico preliminar (corpo lúteo ou folículo) e o lado em que o ovário estava localizado (direito ou esquerdo)... 54**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	benzoato de estradiol
Bi	blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
Bx	blastocisto expandido
cels	Células
CIV	cultivo <i>in vitro</i> de embriões
CL	corpo lúteo
CO ₂	gás carbônico
CR1aa	meio de cultivo de embriões
CR2aa	meio de cultivo de embriões
CsG	Células da granulosa
D0	dia 0
D8	dia 8
D17	dia 17
DG	diagnóstico de gestação
E2	estrógeno, estradiol, estrona ou estriol
F1	primeira geração
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
Gns	Gonadotrofinas
HEPES	tampão utilizado em cultivo celular
IA	inseminação artificial
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
IETS	<i>International Embryo Technology Society</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
KSOM	meio de cultivo de embriões
LH	hormônio luteinizante
ME	mortalidade embrionária
MIV	maturação <i>in vitro</i>

Mo	Mórula
MOET	ovulação múltipla e transferência de embriões
N ₂	Nitrogênio
O ₂	gás oxigênio
OPU	<i>Ovum Pick-Up</i>
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina
PIV	produção <i>in vitro</i>
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
PMSG	gonodotrofina coriônica de égua prenhe
SNC	sistema nervoso central
SOF	fluido sintético do oviduto
TE	transferência de embriões
TETF	transferência de embriões em tempo fixo
TMR	<i>Total Mixed Ration</i>
UI	unidades internacionais
US	Ultrassom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	MORFOLOGIA DO TRATO REPRODUTIVO DA FÊMEA BOVINA.....	20
3.2	NEUROENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO BOVINA.....	22
3.2.1	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.....	22
3.2.2	Hormônios primários da reprodução.....	24
3.2.2.1	Hormônios esteroides gonadais.....	25
3.2.2.2	Outros hormônios da reprodução.....	25
3.3	BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO.....	26
3.4	ETAPAS DA PRODUÇÃO “IN VITRO” DE EMBRIÕES.....	30
3.4.1	Colheita dos oócitos.....	30
3.4.2	Maturação “in vitro”.....	31
3.4.3	Fertilização “in vitro”.....	32
3.4.4	Cultivo “in vitro”.....	33
3.4.5	Transporte de oócitos por longas distâncias.....	34
3.4.6	Transporte de embriões por longas distâncias.....	35
3.5	SINCRONIA RECEPTORA-EMBRIÃO.....	36
3.5.1	Avaliação e seleção de receptoras.....	37
3.6	DIAGNÓSTICO POR IMAGEM.....	38
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	OBJETIVO GERAL.....	41
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5	METODOLOGIA.....	42
5.1	DESCRIÇÃO DO AMBIENTE DA PESQUISA.....	42
5.2	DOADORAS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES.....	45
5.3	SELEÇÃO DE RECEPTORAS.....	47
5.3.1	Sincronização de receptoras.....	48
5.3.2	Avaliação de resposta à sincronização.....	48
5.4	TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES.....	48

5.5	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	49
5.6	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

À medida que a população humana mundial cresce numericamente, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de se produzir proteína de origem animal, com o objetivo de saciar a fome que ainda impera em muitos países. Desse modo, é de extrema importância o fomento à produção de carne e leite, que são fontes importantes desse nutriente.

Nesse contexto, o agronegócio do leite possui um papel de destaque, uma vez que o produto final dessa atividade é um alimento único por seu valor nutritivo e sua composição (GRÁZIA *et al.*, 2016).

A produção leiteira representa uma forma de aproveitamento, em escala mais ampla, da secreção láctea elaborada a cada ciclo reprodutivo dos animais, a partir do nascimento das crias. Pressupõe, portanto, um incremento nessa atividade reprodutiva, isto é, a multiplicação de animais de qualidade, em ritmo acelerado, processo que pode ser favorecido, sobretudo, pela aplicação de biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões, sejam eles produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

No tocante às biotécnicas ligadas à reprodução animal, o Brasil vem se destacando no cenário mundial, principalmente em relação à transferência de embriões, sendo favorecido por fatores como a extensão territorial e efetivo bovino (maior rebanho comercial do mundo), com predominância de zebuínos, que proporcionam uma escala maior de doadoras e receptoras, além do fato de que as médias de oócitos aspirados de vacas zebuínas são superiores às aquelas observadas em vacas taurinas (SENEDA *et al.*, 2005). Ressalte-se também a habilidade crescente dos profissionais do país, que, a cada dia, desenvolvem tecnologias, seja a campo ou em laboratório, fatores estes que contribuem para o incremento dos índices alcançados.

No processo da transferência de embriões bovinos, mais especificamente no que se refere à produção *in vitro* de embriões (PIVE), vários aspectos envolvendo essa técnica devem ser ressaltados. Notável progresso tem sido alcançado nos últimos anos em relação à parte laboratorial, principalmente com respeito aos meios de cultivo, seleção, transporte de oócitos e embriões, novos equipamentos, etc. Porém, muito ainda precisa ser avançado em relação aos procedimentos envolvendo

doadoras e receptoras, para que seja possível o aproveitamento máximo do potencial desses animais.

Quanto às doadoras, estas tendem a manter um perfil regular de produção de ovócitos quando em condições ideais de criação, podendo haver alguma variação na qualidade desses gametas relacionada a fatores de ordem nutricional e conforto ambiental.

Contudo, as receptoras usualmente apresentam maior variação em todos os aspectos. Levando-se em consideração que são utilizadas, para este papel, fêmeas em diversas condições fisiológicas (nulíparas, primíparas e pluríparas), provenientes das mais variadas condições de manejo de acordo com a propriedade, tal variação pode contribuir para a diminuição dos índices de eficiência, influenciando o sucesso do programa.

Quanto a essas variações, podem estar relacionadas a aspectos técnicos propriamente ditos, como nutricionais, sanitários, instalações, mão-de-obra qualificada e comprometida. Deve-se destacar, ainda, a própria disponibilidade de receptoras, e a forma com que estas são selecionadas para o processo.

O número de receptoras utilizáveis em um programa dessa natureza repercute diretamente sobre sua viabilidade econômica. A carência de ventres para desenvolvimento dos conceptos resulta na necessidade de processos de criopreservação, que podem incorporar custos adicionais e encarecer todo o programa.

Haja vista que a maioria das propriedades que se propõe a realizar a PIVE não dispõe de quantidades apropriadas de receptoras para um perfeito andamento do processo (traduzida por uma relação doadora/receptora em torno de 1:10), faz-se necessário maximizar o aproveitamento daquelas que se encontram disponíveis.

Além de características gerais das potenciais receptoras, como estrutura corporal e estado sanitário, que podem ser avaliadas pelo exame clínico, a acurácia de um bom exame ginecológico se faz necessária, uma vez que é o sistema reprodutor dessa fêmea que será utilizado. Nesse sentido, uma palpação retal minuciosa, com auxílio de exame ultrassonográfico, realizada por técnico com experiência na área, se torna imprescindível na disponibilização de um maior número de receptoras para o processo.

Tal profissional avaliará a funcionalidade dos ovários, no tocante à dimensão, presença de estruturas, o perfil uterino, quanto à presença de gestação ou patologias, destinando à recepção de embriões aquelas que realmente expressem as maiores condições de sucesso.

Usualmente, fêmeas destinadas à formação de um plantel de receptoras são identificadas preliminarmente a partir da confirmação do estado de ciclicidade ovariana. Habitualmente, são consideradas cíclicas fêmeas que revelem, ao exame ginecológico, a presença de corpo lúteo em um dos dois ovários. Contudo, esse critério de pré-seleção pode restringir o número de animais disponíveis, já que corpos lúteos só estarão presentes, em condições de diagnóstico, predominantemente em fêmeas na fase de meta-estro tardio ou em diestro, não estando consideradas aptas, as fêmeas em pró-estro e em estro que apresentam folículos maduros no momento do diagnóstico. Considerando-se a fundamentação morfofisiológica e a demanda pelo aumento do número de receptoras disponíveis, o presente estudo foi idealizado como reflexão sobre esses critérios de pré-seleção, com o intuito de estabelecer a viabilidade de fêmeas em estro e pró-estro na pré-seleção de receptoras em programas de transferências de embriões, uma vez que estas também são consideradas fêmeas cíclicas. Com isso, o número de receptoras disponíveis aumentaria consideravelmente nestes programas.

2 JUSTIFICATIVA

Fornecer aos profissionais da área, subsídios para o aprimoramento dos critérios de pré-seleção de receptoras para programas de transferência de embriões, no intuito de incrementar o rendimento técnico e econômico da utilização desta biotécnica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MORFOLOGIA DO TRATO REPRODUTIVO DA FÊMEA BOVINA

O conhecimento dos órgãos que formam o sistema genital feminino é de fundamental importância para o entendimento posterior da fisiologia da reprodução e das causas de infertilidade. Os órgãos femininos da reprodução são compostos de ovários, ovidutos, útero, cérvix uterina, vagina e genitália externa. Os órgãos genitais internos (o primeiro de quatro componentes) são sustentados pelo ligamento largo. Este consiste do mesovário, que suporta o ovário; do mesossalpinge, que suporta os ovidutos e do mesométrio, que suporta o útero (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em bovinos e ovinos, a união do ligamento largo é dorsolateral na região do ílio, local onde o útero dispõe-se como os cornos de um carneiro, com a convexidade dorsal e os ovários localizados próximos à pelve. Os ovários são em número de dois, direito e esquerdo, com funções de produzir ovócitos (armazenar e maturar) e hormônios, como o estrógeno (E2) secretado pelos folículos e responsável pelo comportamento da vaca em cio, a progesterona (P4) produzida pelo corpo lúteo (CL), que prepara o trato reprodutivo para a futura gestação, a inibina pelas células (cels) da granulosa(CsG), etc. (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os ovários têm, assim, funções de gametogênese e esteroidogênese. O ovário, composto de medula e córtex, é envolto pelo epitélio superficial, conhecido comumente como epitélio germinativo. A medula ovariana é constituída por tecido conjuntivo fibro-elástico irregularmente distribuído e por nervos extensos e sistemas vasculares, que atingem o ovário mediante seu hilo. As artérias são distribuídas de forma espiralada. O córtex ovariano contém folículos ovarianos e/ou corpos lúteos em vários estágios de desenvolvimento e regressão. O ovário bovino pesa de 7-19 g, e seu tamanho varia com a idade, raça, alimentação e fase do ciclo estral (SENGER *et al.*, 2012).

O oviduto é constituído de dois tubos sinuosos, direito e esquerdo, com aberturas nos cornos uterinos numa extremidade e junto aos ovários na outra, em forma de funil. Funcionalmente, a tuba uterina pode ser dividida em quatro segmentos: (i) Fímbrias com formato de franjas; (ii) Infundíbulo ou abertura abdominal próximo ao ovário; (iii) Ampola, a porção mais dilatada, que compreende cerca de metade da tuba; e (iv) istmo, porção que liga com o útero. A tuba tem as

seguintes funções: captar o ovócito após a ovulação, fornecer condições adequadas à fertilização (transporte, capacitação e reação acrossômica do espermatozoide e encontro deste com o ovócito), produzir um meio adequado para a sobrevivência do embrião em sua fase inicial e transportar o mesmo até o útero (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O útero é um órgão muscular com enorme capacidade de expansão, constituído de dois cornos bipartidos e uma parte comum, o corpo do útero. O útero dos bovinos acha-se parcialmente suspenso na cavidade abdominal pelo assim chamado ligamento largo ou mesométrio. Sua parede é formada por três camadas, sendo a mais interna denominada endométrio, uma camada intermediária muscular, chamada de miométrio e uma camada mais externa, chamada de perimétrio. O útero tem como funções principais: (i) transporte dos espermatozoides do ponto de ejaculação até o local da fertilização no oviduto; (ii) produção de prostaglandina (PGF₂α) e regulação da função do CL; e (iii) receber e fornecer a vascularização necessária ao embrião recém formado (+/- quatro dias) após a fecundação, ou ao embrião inovulado (fresco ou congelado), aproximadamente sete dias após o estro (GONZÁLEZ, 2002).

A cérvix é um esfíncter musculoso espesso e rígido, localizado entre o útero e a vagina, possuindo várias pregas ou anéis (três a quatro) semicirculares em seu interior. O canal é usualmente fechado (selado durante a gestação), exceto durante o cio e o parto, quando abrem ou relaxem sob ação de E₂. A cérvix não possui glândulas, mas sim células ciliadas e secretoras não-ciliadas, que secretam um muco viscoso, contendo glicoproteínas e enzimas diversas. A secreção do muco cervical é estimulada pelo E₂ (aumenta no estro) e inibida pela P₄ (fase luteal). A cérvix possui várias funções no processo reprodutivo: (i) facilita o transporte espermático através do muco cervical para o interior do útero; (ii) atua como reservatório de espermatozoides; e (iii) pode tomar parte na seleção de espermatozoides viáveis, impedindo a passagem de células espermáticas inviáveis e defeituosas. A vagina tem função primária de servir como órgão copulatório (recebe o pênis na cópula), onde o sêmen é depositado na monta natural, tendo ainda outras funções como canal do parto (passagem do feto ao nascer), secreção de pequena quantidade de muco, excreção das secreções cervicais e endometriais, proteção contra infecções graças a seu meio bioquímico e microbiológico, com

produção de imunoglobulinas (IgA e IgG) na fase luteal, e local para expulsão de urina durante a micção (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em contiguidade à vagina, temos a vulva, que é a abertura posterior do sistema genital feminino. É constituída pelo vestíbulo (início no orifício uretral externo), lábios maiores e menores e clitóris (tecido erétil com terminações nervosas). O vestíbulo estende-se internamente por mais ou menos 10 cm. O clitóris encontra-se encoberto na comissura ventral do vestíbulo, sendo coberto por um epitélio escamoso e estratificado e bem suprido por terminações nervosas sensitivas. Externamente, encontra-se recoberta por pêlos, com mucosa e pele de pigmentação própria da raça. A porção de pele entre o ânus e o ângulo dorso-vulvar, é denominada períneo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

3.2 NEUROENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO BOVINA

3.2.1 Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal

A reprodução em bovinos representa um mecanismo complexo regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, sendo influenciada por fatores nutricionais, sanitários, hereditários e de manejo. As funções orgânicas são reguladas pelos sistemas nervoso e endócrino (hormonal), existindo estreita relação entre os mesmos. O sistema nervoso controla as funções orgânicas por meio de rápidos impulsos nervosos elétricos, como a regulação do sistema musculoesquelético. Já o sistema endócrino utiliza-se de mensageiros químicos ou hormônios para regular processos orgânicos mais lentos, como o crescimento e a reprodução (SENGER *et al.*, 2012).

Um hormônio é classicamente definido como uma substância química fisiológica, orgânica, sintetizada e secretada por uma glândula endócrina sem ducto e transportada via corrente circulatória. Os hormônios têm a ação básica de inibir, estimular ou regular a atividade funcional de seus órgãos ou tecidos-alvos, como exemplo as gonadotrofinas (Gns) hipotalâmicas, bem como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) produzidos pelas células hipofisárias, que, por via sanguínea, chegam aos ovários, onde desempenham suas funções. Os hormônios são caracterizados por terem relativamente curta meia-vida,

definida como o tempo requerido para atuar e desaparecer do sangue ou do corpo (SENGER *et al.*, 2012).

Mecanismos *feedback* positivos ou negativos são fundamentais para o controle da secreção de hormônios reprodutivos. *Feedback* é quando a maior ou menor produção/secreção de um determinado hormônio, substância ou fator estimula o aumento ou a redução na produção e/ou liberação de outros. Um exemplo disso é quando os níveis elevados de P4 produzida pelo CL reduzem a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo, o que caracteriza um mecanismo *feedback* negativo e que resulta na diminuição da secreção de FSH-LH na hipófise (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O hipotálamo é uma área especializada do sistema nervoso central (SNC) situada na base do cérebro (região do terceiro ventrículo), acima e atrás do quiasma óptico. Produz o GnRH pelas células nervosas (neurônios), dispersas nas áreas peri-ventriculares, pré óticas e mediais do hipotálamo, além de diversos outros fatores liberadores. O GnRH ocupa papel central na função reprodutiva de bovinos e, uma vez liberado dos neurônios, chega à hipófise através de um sistema peculiar de vasos denominado “Sistema-Porta-Hipotálamico-Hipofisário”. Os hormônios ocitocina e vasopressina, produzidos nos núcleos supra ótico e paraventricular do hipotálamo, chegam por meio de axônios até a neurohipófise onde aguardam estímulos nervosos capazes de provocar sua liberação (SENGER *et al.*, 2012)

A hipófise ou pituitária é uma estrutura altamente complexa formada por grupos celulares que sintetizam diferentes tipos de hormônios. Está localizada diretamente abaixo do hipotálamo, sendo constituída pela adenohipófise ou hipófise anterior, onde são produzidos, além de outros hormônios, as gonadotrofinas (FSH e LH), cuja síntese é controlada pelo GnRH hipotalâmico, e que são responsáveis pela manutenção funcional dos ovários. Corresponde à parte glandular da hipófise (aproximadamente 75% do seu tamanho) e não apresenta inervação direta, e a neurohipófise ou hipófise posterior, que corresponde a aproximadamente 25% do tamanho, sendo aglandular e apresentando inervação direta. Além de outras funções, armazena ocitocina e vasopressina produzidas no hipotálamo (FLORENTINO, 2011; KÖNIG *et al.*, 2016).

3.2.2 Hormônios primários da reprodução

Os hormônios primários estão envolvidos em muitos aspectos dos processos reprodutivos: espermatogênese, ovulação, comportamento sexual, fertilização, implantação, manutenção da prenhez, parto, lactação e comportamento materno. Novos conhecimentos científicos vêm sendo continuamente gerados em velocidade cada vez maior e certamente informações até agora inexistentes deverão surgir no transcorrer dos anos, confirmando aquelas até agora existentes ou revelando outros mecanismos de controle ainda desconhecidos. Inicialmente, descobriu-se que os ovários produziam os hormônios esteroides, ou seja, E2 no folículo e P4 no CL (MACEDO *et al.*, 2014).

Posteriormente, verificou-se que esta produção de hormônios ovarianos é controlada pela hipófise através das gonadotrofinas (FSH e LH). Já numa etapa seguinte, constatou-se que a hipófise era controlada pelo hipotálamo via produção GnRH, e atualmente sabe-se que outros fatores como os neurônios monoaminérgicos e peptidérgicos de origem hipotalâmica e extra hipotalâmica, respectivamente, atuam no controle da secreção do GnRH hipotalâmico. Pelo exposto, pode-se deduzir que futuramente novos fatores de controle do GnRH deverão ser identificados. O GnRH ou hormônio liberador de gonadotrofinas é um decapeptídeo (neuropeptídeo) produzido no hipotálamo, responsável pela produção de FSH e LH na adenohipófise, com meia vida de sete minutos e baixa imunogenicidade (SENGER *et al.*, 2012).

Quanto às gonadotrofinas, FSH e LH, são hormônios glicoproteicos produzidos pelas células basófilas da adenohipófise, capazes de formar anticorpos. O FSH tem meia vida de 2-4 horas, por ter mais ácido siálico (5%), enquanto o LH tem meia vida mais curta (30 min.) por ter menos ácido siálico (1-2%). Isso porque, para a degradação do hormônio, é necessária a remoção dos resíduos de ácido siálico e, por isso, quanto maior a proporção deste ácido na molécula, maior o tempo de meia vida do hormônio. O LH atua nas células da teca interna do folículo ovariano, estimulando a ovulação, a formação do CL e a secreção de P4, além de atuar em associação com o FSH no crescimento folicular. O FSH atua nas células da granulosa folicular, promovendo o crescimento folicular juntamente com o LH (MACEDO *et al.*, 2014).

3.2.2.1 Hormônios esteroides gonadais

Estrógeno e progesterona são hormônios produzidos no ovário a partir de colesterol, respectivamente pelo folículo e CL, sob ação das gonadotrofinas hipofisárias. A P4 é secretada pelo CL, placenta e glândula adrenal, e prepara o ambiente uterino para o adequado desenvolvimento do embrião aumentando a atividade secretora das glândulas locais e inibindo a motilidade do miométrio, bloqueia a secreção de GnRH e FSH na hipófise, além de auxiliar no desenvolvimento do tecido secretor (alvéolos da glândula mamária). O E2 (estradiol, estrona ou estriol) atua no SNC, induzindo o comportamento de cio na fêmea; potencializa os efeitos da ocitocina na contração uterina; atua no desenvolvimento físico das características sexuais secundárias femininas; estimula o crescimento dos ductos e desenvolve a glândula mamária; induz o pico pré-ovulatório de LH na ovulação (CUNNINGHAM, 2015).

3.2.2.2 Outros hormônios da reprodução

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é uma prostaglandina derivada do ácido prostanóico (20C) produzida no endométrio e folículo pré-ovulatório, sendo responsável pela lise do CL e contração uterina, com ação também na ovulação. É produzida também pela placenta por ocasião do parto. A ocitocina é um octapeptídeo (neuropeptídeo) sintetizado no hipotálamo e armazenado na neurohipófise, sendo também sintetizado no CL. Portanto, tem duas origens: hipotalâmica e ovariana. Atua provocando contrações no miométrio e nas células mioepiteliais que circundam os alvéolos na glândula mamária, resultando na descida do leite (ejeção). Além disso, estimula a secreção uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para o processo de luteólise (CUNNINGHAM, 2015).

As inibinas desempenham um papel importante na regulação hormonal da foliculogênese ovariana durante o ciclo estral. Elas atuam como sinalizadores químicos para a hipófise sobre o número de folículos em crescimento no ovário. A inibina reduz a secreção de FSH até certo nível, o que mantém o número de ovulações espécie-específica tanto nas espécies mono quanto poli-ovulatórias. Pela inibição da liberação do FSH sem alteração da liberação do LH, as inibinas podem

ser parcialmente responsáveis pela liberação diferenciada de LH e FSH pela hipófise (FLORENTINO, 2011).

3.3 BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre fertilização tiveram como referências trabalhos realizados com estrela do mar a partir de 1940, pelo fato que, nesses invertebrados, a fertilização ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea. Posteriormente, surgiram as pesquisas relacionadas com a PIVE, que, em mamíferos, tiveram como marco o nascimento do primeiro bebê de proveta, Louise Brown, na Inglaterra, no ano de 1978 (GONÇALVES *et al.*, 2002).

O primeiro bezerro produzido por fertilização *in vitro* (FIV) nasceu em 1981 nos Estados Unidos, proveniente de oócitos maturados *in vivo* (MIV) (SENEDA *et al.*, 2002). No Brasil, vários laboratórios iniciaram suas pesquisas com FIV no final da década de 1980. Em 1994, uma equipe de pesquisa obteve gestações de embriões zebuínos fertilizados *in vitro* (PEIXER *et al.*, 1994) e, em 1996, pesquisadores da Universidade de São Paulo conseguiram o nascimento de bezerros da raça Nelore mediante os processos de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (AZAMBUJA *et al.*, 1996). O período entre 1999 e 2003 marcou a saída da PIV do laboratório para o campo (VIANA *et al.*, 2012).

A pecuária bovina brasileira tem se mostrado altamente sofisticada, com avanços tecnológicos nas áreas de reprodução e utilização de biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), gerando benefícios econômicos aos criadores (BURATINI JR., 2006).

Para que um programa de TE obtenha sucesso em uma propriedade rural, onde vários indivíduos diferentes e com grau de instrução diferenciado se encontram unidos, uma interação dessa equipe tem que acontecer, onde todos devem “falar a mesma língua” de modo que eles se entendam. Além disso, a correta aplicação da técnica e uma administração eficiente da propriedade têm papel muito importante (REICHENBACH *et al.*, 2002).

Com relação aos embriões produzidos por *ovum pick up* (OPU) / produção *in vitro* (PIV) no ano de 2015, o Brasil produziu 269.353 embriões, o que corresponde a 66% da produção mundial (PERRY, 2016). Conforme os dados

apresentados, atualmente, o Brasil se destaca no cenário internacional como referência na PIVE, tendo superado a biotécnica da ovulação múltipla e transferência de embriões (MOET) e tornando-se a técnica de escolha na produção de embriões (VIANA *et al.*, 2012), especialmente, por ser mais utilizada em raças zebuínas, as quais fisiologicamente possuem uma maior população folicular, maior recuperação de oócitos por aspiração, conseqüentemente, maior produção embrionária (PONTES *et al.*, 2010).

O contínuo e expressivo aumento da PIVE, sustentado principalmente pelas raças zebuínas de corte, estabilizaram-se nos últimos anos, contudo, passou a ser observado um avanço significativo da utilização desta técnica no setor leiteiro a partir de 2005 até os dias atuais (VIANA *et al.*, 2010), onde o país é detentor do terceiro maior rebanho de vacas leiteiras do mundo, composto, em sua maioria, de animais mestiços F1 (Gir X Holandês), os quais são bem adaptados às áreas tropicais. Além disso, as melhorias nas condições de laboratório e de campo, como o transporte de embriões frescos, vitrificação de embriões e o desenvolvimento de novos meios de cultivo, podem potencializar ainda mais o número de embriões produzidos.

A principal vantagem da PIVE é o aumento significativo no número de crias produzidas por fêmea. É possível produzir aproximadamente 50 gestações por ano para cada doadora, sendo que, fisiologicamente, nesse mesmo período, só seria possível obter um produto. Entre outras, destacam-se o aproveitamento de fêmeas com patologias do trato reprodutivo que as impeçam de reproduzir naturalmente, de animais senis, pré-púberes e gestantes, o melhoramento genético acelerado pela utilização de gametas de animais superiores e a facilidade de importação e exportação do material genético (PALHANO, 2008).

Outro fator importante é que, com a PIVE, é possível produzir embriões na espécie bovina sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008). A PIVE, para fins de pesquisa, é importante para elucidar os fenômenos fisiológicos nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Além disso, a PIVE é uma técnica que vem se estabelecendo em todo o mundo, principalmente no Brasil, sendo cada vez mais acessível aos criadores de bovinos (ARRUDA *et al.*, 2012). No entanto, observa-se uma grande variabilidade no

sucesso das TEs bovinos produzidos *in vitro*, e a maioria dos problemas é relacionada com as receptoras (ANDRADE *et al.*, 2012). Fatores como a idade das receptoras, grau de assincronia embrião-receptora, reutilização de receptoras, localização e número de corpos lúteo na receptora, condição nutricional das receptoras, controle do ciclo estral e manejo das receptoras são apontados como os de fundamental importância em programas de PIVE, sendo responsáveis pelo sucesso ou falha na fertilidade dos rebanhos (JONES; LAMB, 2008). Para Spano e Silva (1992), vários são os fatores responsáveis pelos resultados obtidos num programa de PIVE. A concentração de progesterona reflete o crescimento, a manutenção e a regressão luteal. Desse fato, decorre a necessidade de se avaliar tamanho e qualidade de CL, pois ele é responsável pela produção de progesterona, que vai controlar o ambiente uterino, essencial ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da prenhez (THATCHER *et al.*, 2001).

O método mais usual e prático para escolha de receptoras ainda é a projeção do CL por palpação retal. Viana (1996) abordou que esta metodologia não é a mais adequada, pois um CL com pequena projeção pode apresentar uma grande porção inclusa no estroma ovariano e vice-versa. Diante disso, a avaliação ultrassonográfica é muito importante, pois permite avaliar a completa visualização do CL.

A taxa de sobrevivência embrionária após a inovulação pode ser influenciada por fatores como anormalidades cromossômicas, efeito da doadora, idade e qualidade dos embriões inovulados, método e local da transferência, sincronia doadora-receptora, estado nutricional e concentração sérica de progesterona na receptora, bem como estresse calórico (HANSEN; EALY, 1991).

Nos ambientes tropicais, as elevadas temperaturas do ar, ligada à umidade e radiação alta, diminui consideravelmente a eficiência da perda de calor e, com isso, incrementa o estresse térmico (SILVA; MORAIS; GUILHERMINO, 2007), o que se torna limitante ao desenvolvimento, a reprodução e produção animal (TORRES JÚNIOR *et al.*, 2008). O animal tem a capacidade de se ajustar fisiologicamente mediante estresse por calor, em função de alta umidade do ar e temperatura (o que se observa são a temperatura retal e a frequência respiratória), utilizando esses mecanismos fisiológicos, o animal está tentando perder o calor absorvido (AZEVEDO *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2008). É considerado confortável um ambiente quando o animal está em estabilidade, ou seja, quando o calor

produzido pelo metabolismo é perdido para o meio ambiente sem prejudicar sua homeostase (SILVA, 2000).

Dentre os fatores que podem interferir em um programa de TE, podemos citar a nutrição e mineralização dos animais, a sanidade do rebanho, o manejo dos animais (prenhes, vazias, em sincronização, transferidas, feto sexado, paridas, descarte), a estrutura e organização da propriedade e a mão de obra envolvida no trabalho (MARQUES *et al.*, 2008). Além disso, a utilização da PIVE em larga escala nos rebanhos comerciais é restrita devido ao alto custo operacional, ao tempo requerido na rotina de produção e à variação dos resultados obtidos pelos laboratórios. Outros fatores, como as perdas embrionárias, precoces ou tardias, e o nascimento de conceptos relativamente grandes, devem ser considerados, pois representam riscos à rentabilidade da técnica (SCANAVEZ *et al.*, 2013).

Em vista disso, se faz importante uma avaliação precisa das doadoras e receptoras, previamente aos programas de sincronização para transferências de embriões, atentando-se para a condição corporal, sanidade, habilidade materna, status ovariano e uterino, além da exclusão de fêmeas com patologias reprodutivas.

Analisando o processo de transferência de embriões como um todo, três níveis de risco estão envolvidos, são eles: o embrião que será transferido, o sêmen que é utilizado para fecundação dos oócitos *in vivo* ou *in vitro* e a receptora. Faz-se necessário que sejam tomadas medidas que diminuam a possibilidade de contaminação do embrião em todos os três níveis, conferindo ao processo de transferência de embriões menor risco de transmissão de doença.

Quanto à legislação brasileira e dos países do Mercado Comum do Sul (Mercosul), quando se referem a normas sanitárias para a produção de embriões, é mais severa, pois exige que o rebanho de doadoras não tenha sido afetado por febre aftosa ou estomatites vesiculares nos 90 dias precedentes à coleta de embriões e que as doadoras sejam testadas contra brucelose e tuberculose nos 30 dias subsequentemente à coleta (PARRA *et al.*, 2008). O crescimento desta biotecnologia no Brasil permitiu sua aplicação em larga escala e a exportação deste modelo para vários países latino-americanos e de outros continentes (BOLS *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2008).

3.4 ETAPAS DA PRODUÇÃO “IN VITRO” DE EMBRIÕES

3.4.1 Colheita dos oócitos

A colheita de oócitos é considerada a base do programa de PIVE (PIETERSE *et al.*, 1988), podendo ser realizada tanto *in vitro*, por meio de ovários de abatedouros, quanto *in vivo*, através de diversos procedimentos que foram evoluindo ao longo das últimas décadas (GONÇALVES *et al.*, 2008). Quando realizada *in vitro*, através de ovários de abatedouros, é efetuada a punção folicular com agulha acoplada a uma seringa ou bomba de vácuo (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Apesar de bastante utilizada com propósitos científicos e viabilizar o nascimento de um número expressivo de descendentes de doadoras que vieram a óbito, quando realizada de forma comercial, esse procedimento apresenta algumas dificuldades, como: problemas no transporte do abatedouro ao laboratório, o desconhecimento acerca do estado de saúde e do padrão hormonal dos animais, assim como a impossibilidade de repetição da técnica para um mesmo animal (SENEDA *et al.*, 2002).

O advento da ultrassonografia na reprodução animal marcou a evolução da obtenção de oócitos bovinos *in vivo* (BONI, 2012). Os primeiros relatos ocorreram em 1987, em que os ovários eram manipulados por via transretal e posicionados dorso-lateralmente na cavidade abdominal e um transdutor linear com frequência de 3,5 MHz era posicionado externamente na pele, na região paralombar, de forma que fosse possível a visualização dos folículos e sua punção por meio de agulhas específicas (SENEDA *et al.*, 2002).

Posteriormente, Pieterse *et al.* (1988), a partir de modificações da técnica usada para humanos, descreveram a aspiração folicular via transvaginal por meio da ultrassonografia, tornando viável o aproveitamento de oócitos de forma simples e inócua, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal, sem as limitações descritas nos procedimentos anteriores. Na OPU, um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação de oócitos e líquido folicular para um tubo coletor. Em seguida, é feita a procura e seleção dos oócitos viáveis, em microscópio estereoscópico, de acordo com sua morfologia, aqueles selecionados são então, transportados até o laboratório onde se inicia as etapas de PIV (GARCIA *et al.*, 2004).

A associação da OPU com a PIVE tornou-se uma alternativa interessante para a produção de embriões principalmente por poder ser aplicada independentemente do estado reprodutivo da doadora, ou seja, fêmeas gestantes, acíclicas, além daqueles animais com alterações patológicas do aparelho reprodutor localizadas na tuba ou útero, e ainda naquelas que não respondem a superovulação (BONI, 2012).

Atualmente, a OPU encontra-se relativamente estabilizada quanto ao uso de equipamentos e aparato técnico, com poucas expectativas de mudanças. Relatos de campo mostram que uma dupla bem treinada consegue realizar a aspiração e seleção de oócitos de 20 vacas por dia, apresentando resultados bastante satisfatório e capaz de promover demanda suficiente para as etapas posteriores da produção de embriões (SENEDA *et al.*, 2005).

3.4.2 Maturação “in vitro”

Durante a maturação, primeira etapa laboratorial da PIV, os oócitos colhidos passam por uma série de transformações do núcleo e do citoplasma, maturação nuclear e citoplasmática tornando-os aptos a serem fertilizados (GORDON, 2003). A maturação nuclear, *in vivo*, inicia após o pico pré-ovulatório de LH, enquanto que *in vitro*, esse processo é iniciado logo após a remoção do oócito do ambiente folicular, quando é retomada a meiose.

Células somáticas (da granulosa e do *cumulus oophorus*) têm um papel importante durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro* (MIV) (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008). Elas interagem com os oócitos através das junções *gap*, facilitando a passagem de nutrientes e proteínas reguladoras que participam do crescimento e da maturação destes (MIYANO, 2003).

Para que todos os eventos de maturação oocitária ocorram *in vitro* é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (GARCIA *et al.*, 2004). A adição de alguns hormônios ao meio, com LH, FSH, ou ainda a associação de ambas as gonadotrofinas com hormônios esteroides, tem sido implementada em função da especificidade da ação que cada hormônio deve exercer tanto para maximizar a porcentagem de oócitos que completam a meiose quanto para

aumentar a capacidade de fecundação e desenvolvimento até o estágio de blastocistos (ALVES *et al.*, 2001; SAEKI *et al.*, 1991).

Com poucas exceções, a MIV de oócitos bovinos é realizada a 39 °C por 22 a 24h em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES *et al.*, 2002). Somente após a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática é que o oócito torna-se competente para a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008).

3.4.3 Fertilização “in vitro”

Cada gameta (célula haploide) possui apenas um cromossomo sexual, o feminino (oócito) é portador do cromossomo sexual “X” e o masculino (espermatozoide) possui o cromossomo sexual “X” ou “Y”. Dessa forma, o sexo genético é determinado pelo cromossomo sexual presente no espermatozoide (“X” ou “Y”), no momento da fertilização (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

De forma natural na reprodução, para as espécies mamíferas, a proporção do sexo esperada é de aproximadamente 50:50 (XU *et al.*, 2009). A busca por métodos capazes de selecionar o sexo dos animais sempre foi um desafio para a humanidade e objeto de estudos ao longo dos anos (ARRUDA *et al.*, 2012; WHEELER *et al.*, 2006). Depois de diversas técnicas experimentadas, a sexagem de espermatozoides através da citometria de fluxo é largamente aceita com grande avanço entre as tecnologias da reprodução (BLONDIN *et al.*, 2009).

A precisão da sexagem é de aproximadamente 85-95% e a velocidade de separação das células espermáticas, que no início da técnica era de 300.000 células/hora aumentou atualmente para 15-20 milhões/hora. Entretanto, esta velocidade de separação continua a ser um gargalo para a ampliação do uso de sêmen sexado em larga escala (XU *et al.*, 2009).

Os altos preços das doses de sêmen sexado aliado aos resultados inconsistentes quando utilizado na inseminação artificial (IA) têm limitado sua expansão (SEIDEL; SCHENK, 2008). No entanto, os resultados são animadores quando associado à PIV (PONTES *et al.*, 2010). Na IA, em média, 2×10^6 espermatozoides são necessários para fertilizar um oócito; já na FIV, podem ser usados, em média, apenas 1.000 espermatozoides por oócito, maximizando o aproveitamento da dose inseminante (YANG *et al.*, 1993).

No entanto, a técnica ainda está em desenvolvimento e é inegável o grande avanço proporcionado pelo seu uso na indústria de PIVE bovina. As perspectivas são altamente favoráveis, especialmente, com o aumento da mesma no segmento da pecuária leiteira (ARRUDA *et al.*, 2012).

A fertilização é caracterizada pela fusão do espermatozoide com o oócito, após ocorre a exocitose dos grânulos corticais e a retomada da meiose com extrusão do segundo corpúsculo polar e formação do pró-núcleo feminino. O núcleo espermático se descondensa transformando-se no pró-núcleo masculino (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Os pró-núcleos masculino e feminino migram para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem, iniciando o desenvolvimento embrionário (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Para que ocorra a fertilização *in vivo* é necessário que o espermatozoide percorra um longo trajeto pelo trato genital da fêmea até chegar ao local de fertilização no oviduto. Durante este percurso, glicosaminoglicanos presentes no interior do trato reprodutivo feminino induzem sua capacitação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Para a FIV, a capacitação espermática é geralmente promovida pela heparina, um glicosaminoglicano presente em altas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (BLONDIN *et al.*, 2009).

O co-cultivo de espermatozoides e oócitos, é realizado por um período de 6-9 h ou 18-22 h, a depender da rotina do laboratório, a 39 °C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008). O sistema de FIV tenta mimetizar as condições *in vivo*. Porém, resultados variados são obtidos com espermatozoides oriundos de touros ou partidas diferentes. Uma média de 40% ou mais dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até o estágio de blastocisto (BAVISTER, 2002).

3.4.4 Cultivo “in vitro”

O cultivo embrionário *in vitro* (CIV) corresponde ao desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. É durante este período que ocorrem eventos como: ativação do genoma embrionário (transcrição materno-zigótica), divisão celular (clivagem), compactação dos blastômeros no estágio de mórula,

início da diferenciação embrionária (células do trofoblasto, que darão origem à placenta e anexos fetais, e células da massa celular interna, que formarão o feto propriamente dito) com a formação da blastocele (GARCIA *et al.*, 2004). Esses fenômenos podem ser afetados por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, como íons inorgânicos, tampões, composição da atmosfera gasosa, aminoácidos, pH, fatores de crescimento, luminosidade, vitaminas e macromoléculas (CAMARGO *et al.*, 2006).

Atualmente existe uma grande variedade de meios de cultivo para o desenvolvimento embrionário, sendo as condições de CIV de fundamental importância para obtenção de bons índices de produção (GARCIA *et al.*, 2004). De acordo com sua formulação, os meios podem ser classificados em: indefinido, semi-definido ou definido (CAMARGO *et al.*, 2006).

Entre os principais meios de cultivo embrionário disponíveis no mercado, estão o SOF (fluido sintético do oviduto), o KSOM, o CR1aa e o CR2aa. O uso de meios sequenciais também vem sendo utilizado, devido às variações nas exigências nutricionais dos embriões durante o seu crescimento. Estes são modificados durante o cultivo, de forma a simular às condições encontradas nos diferentes locais do trato reprodutivo durante o período de pré-implantação embrionária (CAMARGO *et al.*, 2006).

O cultivo embrionário *in vitro* varia de 7-9 dias a 39 °C, atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia após a fecundação, quando são transferidos, sendo que os blastocistos podem permanecer na estufa até o 9º dia para avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2008).

3.4.5 Transporte de oócitos por longas distâncias

No Brasil, em função da grande extensão territorial, as condições de transporte de oócitos até os laboratórios de PIVE são consideradas como fator limitante na produção comercial de embriões bovinos. Em muitos casos, o tempo transcorrido nesses transportes pode interferir diretamente na viabilidade dos oócitos e nas posteriores etapas da PIV (LEIVAS *et al.*, 2004; TESSMANN *et al.*, 2004).

Alguns aspectos como, o meio utilizado, recipientes onde são acondicionados, a duração do transporte e a temperatura entre a coleta e a chegada

ao laboratório podem influenciar no desenvolvimento embrionário *in vitro* (TESSMANN *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2000).

Quando o transporte é realizado por um período curto, o uso do próprio líquido folicular pode ser uma alternativa, pois substâncias presentes neste líquido proporcionam graus variáveis de bloqueio da meiose, possibilitando maior sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática, sendo adequado para a manutenção dos oócitos por pouco tempo; entretanto, por períodos prolongados este bloqueio pode provocar redução nas taxas de embriões produzidos (LEHMKUHL *et al.*, 2002; VIZCARRA *et al.*, 2000).

O uso de meio de maturação no transporte de oócitos se faz interessante, uma vez que, proporciona condições adequadas de maturação já durante o transporte, melhorando os resultados da PIVE quando comparado ao transporte em meios de manutenção (GARCIA *et al.*, 1998). Entre os principais métodos de transporte adotados pelos laboratórios estão: o uso de criotubos ou tubos de ensaio em estufas portáteis em que o pH do meio é controlado pelo sistema bicarbonato/CO₂ (KAISER *et al.*, 1999), o uso de meios que contenham tampão orgânico (HEPES), que não necessita de controle da atmosfera (LEIVAS *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2011), o uso de tubos de poliestireno em banho Maria (OLIVER *et al.*, 1998) ou placas de cultivo acondicionadas em bolsas plásticas seladas (PALMA *et al.*, 1998).

A busca por alternativas práticas e eficientes para o transporte de oócitos bovinos aspirados no campo até os laboratórios tende a continuar dentro do contexto nacional no qual está inserida a PIVE bovinos (SILVA *et al.*, 2011).

3.4.6 Transporte de embriões por longas distâncias

Em um programa de PIVE em larga escala existem algumas limitações. Uma delas é a distância entre os laboratórios de PIV e as propriedades rurais onde são criadas as receptoras. Muitas vezes as fazendas com grandes rebanhos bovinos em que os animais são utilizados como receptoras estão localizadas em áreas novas de produção, como ao Norte e Nordeste do Brasil, enquanto que os grandes centros de PIV estão a milhares de quilômetros de distância, nas regiões Sul e Sudeste (MARINHO *et al.*, 2012).

Uma alternativa para longas distâncias é o transporte de embriões no próprio meio de cultivo, onde de acordo com a distância, os embriões são transportados em diferentes estádios de desenvolvimento de forma que o fim do transporte coincida com o fim do cultivo, ou seja, o dia sete do CIV (dia 0 = dia da FIV). Assim as últimas etapas de desenvolvimento ocorrem durante o transporte, sendo este realizado em incubadoras portáteis simulando as condições do laboratório (39 °C e 5% de CO₂ em ar) (PONTES *et al.*, 2010).

3.5 SINCRONIA RECEPTORA-EMBRIÃO

A variabilidade nos resultados das transferências de embriões produzidos *in vitro* ainda é um dos entraves para a sua expansão, e a maioria dos problemas são relacionados com as receptoras (MARINHO *et al.*, 2012). Entre os fatores que afetam as taxas de gestação, a sincronia entre o trato reprodutivo da receptora e o embrião no momento da inovulação é de grande relevância (ANDRADE *et al.*, 2012). Maiores conhecimentos da função ovariana, por meio da ultrassonografia, permitiram a elaboração de protocolos eficientes em controlar o status luteínico e folicular em receptoras de embrião, possibilitando uma eficiente sincronização e permitindo a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007; BÓ *et al.*, 2006).

Entre os protocolos existentes no mercado, destacam-se os tratamentos com dispositivos de progesterona/progestágenos e estrógenos, os quais têm apresentado altas taxas de aproveitamento de receptoras (85-90%) e de gestação (40-50%), além de eliminar a necessidade de detecção de estro, viabilizando programas de transferência de embriões em tempo fixo em larga escala (BÓ *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010). A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária. Diversas mudanças ocorrem no útero durante o desenvolvimento embrionário, mediadas principalmente pela progesterona (REIS *et al.*, 2006). Quando embriões são produzidos *in vivo*, a sincronia entre a receptora e o embrião transferido é estimada pela comparação entre a data do cio das receptoras e da doadora. Na PIVE, essa sincronia é estimada pelo cio das receptoras e o dia da FIV.

Dias *et al.* (2006) descreveram que a taxa de gestação foi influenciada pela sincronia embrião-receptora e consideraram esta variável como uma das mais importantes na seleção das receptoras em programas de produção de embriões.

3.5.1 Avaliação e seleção de receptoras

A caracterização do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA *et al.*, 1999). A seleção das receptoras no dia da transferência de embriões geralmente é realizada levando-se em consideração o tamanho do CL à palpação transretal. Este método, apesar da praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação, dada a sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER; NEBEL; WHITMAN, 1989). O trabalho realizado por Viana (1996) mostrou que a escolha das receptoras pela projeção do CL não é adequada. Um CL com projeção pequena pode apresentar uma grande porção embebida no estroma ovariano, enquanto que um CL com projeção maior pode apresentar massa luteal total pequena. Assim, a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho do CL.

Um método mais eficiente de estimar a massa luteal total por palpação transretal é pelo aumento de volume que o CL proporciona ao ovário no qual está presente (FERNANDES; VELÁSQUEZ, 1997). A ultrassonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (PIERSO; GINTHER, 1987; RIBADU *et al.*, 1994).

O manejo das receptoras para a transferência dos embriões produzidos *in vitro* pode ser realizado por diferentes métodos, tais como por meio da observação da manifestação natural do estro, da utilização de tratamentos hormonais com intuito de sincronização do estro, e da utilização de protocolos hormonais com o intuito de sincronização da ovulação para TETF. Todos esses métodos são eficazes para aumentar o número de bezerros produzidos por embrião transferido (JONES; LAMB, 2008).

O método de observação da manifestação natural do estro apresenta algumas desvantagens como o fato de exigir um maior número de animais, depender de uma eficiente detecção do estro e não se ter controle da data da

inovulação. Em contrapartida, no método de utilização de protocolos hormonais com o intuito de sincronização da ovulação para TETF, o número de animais pode ser reduzido, não há a necessidade de observação do estro, e a data da transferência poder ser programada. No entanto, há o custo adicional com hormônios (BÓ *et al.*, 2006).

3.6 DIAGNÓSTICO POR IMAGEM

A ultrassonografia ou ecografia é um método de diagnóstico para exploração de estruturas, através da emissão de ultrassom e captação de ecos. Constitui-se em uma técnica complementar ao exame clínico e é utilizada para avaliação de tecidos moles em todas as espécies. É uma técnica não invasiva e não provoca modificações biológicas, tanto aos pacientes como ao operador. A ultrassonografia permite a avaliação do tamanho, da forma, da localização e da consistência de órgãos em funcionamento ou o monitoramento de suas funções. Para obtenção de imagens precisas, a necessidade de uma perfeita interação entre o homem, a máquina e o paciente. O som é uma onda mecânica caracterizada por compressão e rarefação, dentro de um meio, audível pelo homem (8-20 kHz) ou pelo cão até 50 kHz. Uma onda sonora possui comprimento, frequência e velocidade. O comprimento é o número de ciclos que ela percorre em um dado período de tempo, medido em ciclos por segundo ou Hertz.

O ultrassom é caracterizado por uma onda sonora com frequência muitas vezes superior à que é percebida pelo ouvido humano, medida em MHz. A velocidade do som varia conforme a textura das áreas a serem examinadas, mas são muito próximas, na maioria dos tecidos moles, com exceção do ar, dos ossos e dos pulmões. Ondas ultrassônicas são emitidas a uma velocidade constante até encontrarem uma superfície refletora. Nessa superfície, uma pequena porção do som é refletida e captada pelo transdutor. O transdutor possui cristais de quartzo que têm propriedades piezelétricas, como a da transformação de um tipo de energia em outro, como por exemplo, mecânica em elétrica. O aparelho converte essa transformação em pontos de luz em uma tela conversora de varredura. A amplitude do ponto na tela é proporcional à distância percorrida. Assim, temos reconstruída uma imagem dos tecidos e órgãos atingidos pelo ultrassom.

As ondas sonoras são atenuadas à medida que percorrem os órgãos do animal examinado. As principais causas de atenuação são: absorção, reflexão e espalhamento. De acordo com a natureza e capacidade de absorver e refletir os feixes de ultrassom, os tecidos são caracterizados na imagem gerada dentro de uma escala que vai desde o preto (anecoico) até o branco (hiperecoico), com vários tons intermediários de cinza. Existe uma terminologia própria para interpretar essas imagens que são: anecoico, ecoico, hipoeicoico, hiperecoico, isoecoico e interfaces. Para a realização do diagnóstico ecográfico de gestação, a fêmea deve ficar contida de tal maneira que ofereça segurança tanto para o examinador como para o equipamento. O equipamento de ultrassonografia deverá ficar posicionado em plano elevado, permitindo fácil visualização da tela em ambiente de pouca luminosidade, protegido de chuva e poeira. Os transdutores para uso retal, possuem geralmente uma frequência de 5 a 7,5 MHz e deverão ser recobertos com plástico descartável (FIGUEREDO; FREITAS, 2002).

O uso da ultrassonografia nos estudos da reprodução bovina revolucionou o conhecimento da fisiologia reprodutiva (VASCONCELOS; SANTOS, 2006), pois as imagens geradas com ultrassom (US) ajudaram a esclarecer alguns mecanismos, como dinâmica folicular, formação do CL e desenvolvimento do feto. O uso de US na reprodução de bovinos, principalmente do acompanhamento da dinâmica folicular, teve início com Pierson e Ginther (1987) e intensificou-se nos últimos 20 anos. O US pode substituir com maior precisão a palpação retal para detecção de prenhez e diagnósticos de estruturas fisiológicas, bem como de patologias uterinas e ovarianas, além de permitir o diagnóstico de gestação precoce e sexagem fetal.

A ultrassonografia em escala cinza para diagnóstico é o avanço tecnológico mais expressivo no campo da reprodução clínica e da pesquisa de grandes animais desde a introdução da palpação transretal e do radioimunoensaio para dosagem de hormônios da circulação sanguínea. A área de reprodução em grandes animais foi a que mais se beneficiou com a tecnologia do US. O uso da ultrassonografia na rotina de exames reprodutivos de rebanhos bovinos é de grande contribuição para os técnicos, desde que avaliado previamente o custo x benefício. O uso da ultrassonografia permite um diagnóstico de gestação (DG) precoce das vacas que não conceberam, para que sejam mais rapidamente inseminadas novamente. O uso do US não aumenta a acurácia no DG com mais de 45 dias em relação a palpadores mais experientes, mas pode ser útil para aqueles mais

inexperientes. Mais importante que diagnosticar precocemente a vaca gestante é diagnosticar a vaca não prenhe (vazia) para adiantar sua próxima inseminação artificial (IA).

Um técnico treinado em ultrassonografia pode detectar gestação de 25 dias com 85% de precisão, e de 28 a 30 dias com 100% de precisão, sem qualquer efeito adverso para o embrião ou feto (STEVENSON, 1996). Após o DG precoce com US (possível entre 26 a 28 dias), há risco de perda embrionária posterior, pois aproximadamente 10 a 16% das vacas diagnosticadas gestantes no dia 28 pós IA perdem a gestação até os 56 dias. Essa mortalidade embrionária (ME) é maior em vacas (20%) que em novilhas (5%). Portanto, as vacas prenhes aos 28 dias devem ser novamente examinadas \pm 60 dias pós IA.

Além do mais, o exame ultrassonográfico permite a identificação de vacas e novilhas com gestações gemelares, além de diagnóstico mais preciso de algumas condições ou patologias do ovário (cistos, CL, folículos) e do útero (piometra, fibroses), não possíveis pela palpação retal em muitos casos. Também podemos determinar o sexo fetal (52 a 60 dias), sendo relevante esta informação para decisões de manejo e comercialização de matrizes.

A crescente utilização da ultrassonografia tem proporcionado um salto de qualidade na assistência veterinária em algumas regiões do país no âmbito da reprodução animal. As falhas na concepção e morte embrionária precoce podem ter seus efeitos minimizados mediante uma maior precisão e rapidez diagnóstica.

Novas biotecnologias como indução e sincronização do estro, transferência e produção de embriões *in vitro* têm sido otimizadas. Considerando ainda que a média dos índices reprodutivos brasileiros, mesmo com todos os avanços tecnológicos, apresente poucos sinais de progresso, as utilizações de técnicas de diagnóstico mais precisos podem contribuir substancialmente para reversão desse quadro. Para isso, as instituições de ensino, cooperativas, núcleos de criadores, profissionais liberais e entidades afins devem avaliar o potencial incremento que poderá ser gerado na produtividade com adoção dessa tecnologia.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade técnica da inclusão de matrizes como receptoras em programas de transferência de embriões a partir da detecção de folículos maduros nos exames preliminares.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ponderar a possibilidade de elevar o número de receptoras disponíveis para um programa de transferência de embriões, visando à diminuição dos custos individuais por bezerro gerado;
- Avaliar o desempenho de receptoras selecionadas a partir de diferentes critérios (presença de corpo lúteo ou folículos maduros), com respeito ao percentual de gestações continuadas e partos a termo ao final do ciclo reprodutivo;
- Avaliar o efeito do estágio de desenvolvimento do embrião inovulado sobre os resultados do programa de TE.

5 METODOLOGIA

5.1 DESCRIÇÃO DO AMBIENTE DA PESQUISA

O estudo foi desenvolvido em duas propriedades. A primeira é denominada Fazenda São José (Fig. 1-2). Está localizada no município de Tabuleiro do Norte-CE (latitude 5°11'56" S e longitude 38°04'30" O), a 35 m de altitude, numa região caracterizada por apresentar clima tropical quente, semiárido, com temperatura média de 27,7 °C e 759 mm de precipitação pluviométrica média anual.

Possui uma área de 605 ha, e um rebanho de 1.355 cabeças de bovinos. Essa fazenda desenvolve um projeto de pecuária leiteira composto por animais da raça Girolando, nos graus de sangue $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, e da raça Gir Leiteiro. Existem dois modelos de produção: a pasto, em *pivots*, onde esses animais têm acesso a bebedouros de água e saleiros, sendo suplementados (concentrado) através de canzís no momento em que se dirigem à ordenha. Também existe outro modelo, de confinamento, em que essas matrizes permanecem em um confinamento do tipo *Free Stall* de 400 contenções, se deslocando somente à sala de ordenha, e recebendo no cocho, uma dieta à base de *Total Mixed Ration* (TMR), composta por volumoso, concentrado, mineral e aditivos.

Figura 1 – Vista aérea da Fazenda São José, em Tabuleiro do Norte, Ceará



Fonte: Google Earth (2018).

Figura 2 – Entrada da Fazenda São José, em Tabuleiro do Norte, Ceará



Fonte: Elaborada pelo autor.

A outra propriedade, denominada Fazenda Nova (Fig. 3), está localizada no município de Major Sales-RN ($6^{\circ} 25'24''$ de latitude sul e $38^{\circ}20'08''$ de longitude oeste), a 301 m de altitude, situada em uma região de clima semiárido quente (classificação AW), com temperatura anual média de $26,2^{\circ}\text{C}$ e precipitação pluviométrica média de 845 mm/ano. Possui uma área de 1.300 ha, e um rebanho composto de 752 cabeças.

Esta propriedade é responsável pela recria das fêmeas produzidas na Fazenda São José, em regime de confinamento no período seco e a pasto no período das chuvas, somente com suplementação mineral em saleiros apropriados. Durante o período de confinamento, essas fêmeas recebem dieta do tipo TMR com suplementação mineral em saleiros.

Em ambas as fazendas, é seguido um calendário sanitário, onde são realizadas as principais vacinas: febre aftosa, raiva, clostridiose, brucelose, doenças reprodutivas (IBR, BVD, Leptospirose), além de vermifugações de acordo com a faixa etária, e de forma estratégica. Também há uma preocupação com o serviço de casqueamento do rebanho, tanto preventivo como curativo, uso de pedilúvios e lava-pés, evitando assim outros problemas sanitários.

Figura 3 – Vista aérea da Fazenda Nova, em Major Sales, Rio Grande do Norte



Fonte: Google Earth (2018).

Foram utilizadas 1.015 receptoras neste experimento, as quais pertenciam às raças Girolando, Gir leiteiro e Nelore, sendo parte delas lactantes e outras secas, além de nulíparas. Tais receptoras estavam sob regime semiextensivo, onde parte delas (lactantes) permanecia em confinamento e o restante (secas) em regime de pasto (*Panicum spp.*) e sal mineral à vontade.

Quatro avaliações experimentais foram conduzidas. Iniciou-se com a avaliação ginecológica e seleção de possíveis receptoras. Na segunda, avaliou-se a resposta destas ao protocolo de sincronização (presença de CL). Na terceira, realizou-se o DG (Fig. 4) e, em um quarto momento, averiguou-se o número de gestações que vieram a termo.

Figura 4 - Realização de exame ginecológico por palpação retal com auxílio de ultrassonografia



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 DOADORAS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

As doadoras de ovócitos foram fêmeas das raças Gir Leiteiro (Fig. 5), oriundas de uma central de doadoras em Uberlândia-MG. A aspiração folicular foi realizada com a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom, também conhecida como *Ovum Pick-Up* (OPU) (Fig. 6). Os ovócitos aspirados eram classificados quanto à qualidade em graus de 1 a 4 (PALMA, 1998) e transportados ao laboratório, onde foram maturados, fertilizados e cultivados sob ambiente controlado. Após a produção, os embriões foram classificados, sendo utilizados apenas os de grau 1 (excelente) e 2 (bom).

Figura 5 – Registro fotográfico de vaca doadora de embriões da raça Gir



Fonte: Associação Brasileira dos Criadores da Raça Gir Leiteiro (2013).

Figura 6 – Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 SELEÇÃO DE RECEPTORAS

As receptoras passaram por uma avaliação visual (exame clínico), de seu estado geral (escore de condição corporal, presença de excesso de ectoparasitas ou qualquer outro problema clínico). Aquelas que apresentaram melhores condições físicas foram selecionadas, passaram por exames de avaliação do útero e dos ovários através de palpação retal com auxílio de exame ultrassonográfico (100 Falco – Esaote Piemedical) com transdutor linear de 5 a 7,5 MHz.

Todas as informações geradas por estes exames eram anotadas em fichas desenvolvidas para este propósito, e, depois, tais dados, lançados em computador (Fig. 7), para que, dessa forma, pudesse ser gerada uma nova lista das receptoras que estavam realmente aptas ao início do processo hormonal. Foram consideradas aptas à recepção do embrião, as matrizes que apresentavam estruturas ovarianas, como: CL, folículo pré-ovulatório/maduro ou cisto.

Figura 7 - Escritório da fazenda com sistema informatizado



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.1 Sincronização de receptoras

O protocolo hormonal utilizado para a sincronização baseou-se nos convencionais, onde se iniciava pela introdução de um dispositivo intravaginal com 1 g de progesterona no Dia 0 (D0) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE). No Dia 8 (D8), remoção do dispositivo intravaginal + 0,15 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ + 0,5 mg de cipionato de estradiol + 1.500 UI de gonodotrofina coriônica de égua prenhe (PMSG).

5.3.2 Avaliação de resposta à sincronização

No dia 17 (D17), no momento da inovulação dos embriões, as receptoras foram avaliadas por palpação retal para avaliação da resposta ao protocolo hormonal representada pela presença do CL e o lado dele (ovário direito ou esquerdo), bem como para a classificação em 1 (excelente), 2 (bom), 3 (regular). Somente as matrizes que possuíam CL receberam embrião.

5.4 TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES

Os embriões foram transportados ainda em meio de cultivo e envasados no laboratório da fazenda. Após anestesia epidural, os embriões produzidos *in vitro* foram transferidos (depositados) no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente. A transferência dos embriões foi realizada por técnicos especializados (Fig. 8), pelo método transcervical (não cirúrgico).

Figura 8 - Procedimento de inovulação em vacas



Fonte: Elaborada pelo autor .

5.5 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Em torno de 23 dias após a inovulação, ou seja, aproximadamente 30 dias de gestação, as receptoras eram submetidas ao DG. Aquelas que apresentavam diagnóstico positivo eram submetidas a um diagnóstico de confirmação após um período médio de 30 dias depois, onde passariam a compor um lote de fêmeas gestantes. Faltando 30 dias para o provável parto, estas eram deslocadas para a maternidade, onde eram submetidas a uma dieta diferenciada (aniônica), além de cuidados suplementares, para que pudessem levar suas gestações a termo.

Após a parição, dependendo do grau de sangue da matriz, o bezerro(a) (Fig. 9) era separado da mãe, recebia todos os cuidados de um neonato (ingestão de colostro, desinfecção de umbigo, identificação), e destinado ao bezerreiro (tipo tropical). Essa fêmea, agora lactante, no momento adequado era destinada à rotina de ordenha e, após 25 dias, era submetida a uma avaliação ginecológica e, caso não apresentasse nenhuma alteração em seu aparelho reprodutivo, já era liberada para servir novamente como receptora. As que apresentavam diagnóstico negativo, tanto no primeiro quanto no segundo exame, retornavam ao lote de receptoras onde seriam reavaliadas para nova TE.

Figura 9 - Bezerras oriundas de produção “in vitro” de embriões



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados da investigação foram tabulados em planilha eletrônica do Programa Excel, sendo registrados dados referentes ao *status* reprodutivo de cada uma das matrizes avaliadas em três momentos, quais sejam: (1) avaliação preliminar (exame ginecológico realizado em todas as fêmeas disponíveis para a seleção de receptoras); (2) confirmação do sucesso da implantação do embrião, representado pela continuidade da gestação (60 dias após o procedimento de inovulação); e (3) resultado final da gestação, na forma de parto a termo ou perda fetal. Registraram-se também dados referentes ao estágio de desenvolvimento do embrião selecionado para inovulação, nas categorias: mórula, blastocisto inicial, blastocisto tipicamente caracterizado, e blastocisto expandido.

Os dados foram, então, submetidos à análise estatística, considerando um estudo de dispersão de frequência, aplicando-se o teste de Qui-quadrado, sendo os resultados expressos como percentagens e considerando-se as diferenças significativas em nível de 5%. Realizou-se ainda análise da Razão de Possibilidades (*Odds Ratio*), sendo esses resultados apresentados juntamente com o intervalo de confiança que contenha 95% dos dados. O pacote estatístico SAS (2002) foi empregado na realização de ambas as formas de análise dos dados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, foram realizadas 847 TEs. Desse total, 289 fêmeas obtiveram DG positivo no exame ginecológico executado após a inovulação, perfazendo 34,12% de aproveitamento. Das 289 gestações confirmadas, 225 resultaram em partos a termo, correspondentes a 26,56% do total de transferências inicialmente realizadas e 78% do número de fêmeas que obtiveram diagnóstico positivo no exame ginecológico após 23 dias da inovulação. Esses valores são equivalentes aos resultados apresentados por Morais *et al.* (2008), porém são inferiores àqueles descritos por Vieira *et al.* (2002) e por Scanavez *et al.* (2013).

De acordo com Andrade *et al.* (2012), a variabilidade do sucesso das TEs ainda é um dos entraves para sua expansão, e a maioria dos problemas são relacionados com as receptoras. Fatores como o grupo étnico ao qual pertence a doadora, o embrião, a receptora, a qualidade do embrião, sistema de cultivo, características do corpo lúteo da receptora, sincronia de eventos reprodutivos entre a doadora e a receptora, manejo após a inovulação, variáveis bioclimáticas e outros, estão entre as muitas causas de variação nos resultados obtidos (GRÁZIA *et al.*, 2016; HONORATO *et al.*, 2013).

Considerando-se que o principal foco do trabalho era avaliar a importância dos critérios de seleção prévia de receptoras para um programa de TEs, as comparações foram direcionadas para investigar o efeito da presença de CLs ou folículos maduros nos ovários dessas matrizes durante a realização dos exames preliminares (destinados à preparação do rebanho de receptoras consideradas aptas para o programa) sobre as variáveis indicativas de sucesso pela aplicação da biotécnica.

Os percentuais de aproveitamento de matrizes para o programa de TEs de acordo com o tipo de estrutura encontrada no exame ginecológico preliminar (CL ou folículo) e o lado em que o ovário estava localizado se encontram sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Percentual de aproveitamento de matrizes para o programa de transferência de embriões de acordo com o tipo de estrutura encontrada no exame ginecológico preliminar (corpo lúteo ou folículo) e o lado em que o ovário estava localizado (direito ou esquerdo)

Estrutura	Percentual	Nível de significância	Razão de possibilidades (<i>Odds Ratio</i> - OR)	IC _{95%} da OR
Corpo lúteo	84,02% (773/920)	0,1261 n.s.	0,6701	0,4001 – 1,1223
Folículo	77,89% (74/95)			
CLOD	84,81% (525/619)	0,3468 n.s.	0,8378	0,5793 – 1,2117
CLOE	82,39% (248/301)			
Folículo OD	72,88% (43/59)	0,1317 n.s.	2,3070	0,7639 – 6,9672
Folículo OE	86,11% (31/36)			
OD	83,78% (568/678)	0,1589 n.s.	0,9316	0,6572 – 1,3204
OE	82,79% (279/337)			

. IC_{95%} = Intervalo de confiança da Razão de Possibilidades (OR) para nível de significância de 5%; CLOD = corpo lúteo no ovário direito; CLOE = corpo lúteo no ovário esquerdo; OD = Ovário direito; OE = Ovário esquerdo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos revelaram que, dentre as matrizes que apresentaram CL nos exames ginecológicos preliminares, 84,02% confirmaram estarem efetivamente em atividade cíclica ovariana no início dos procedimentos de sincronização de cio, e foram incluídas no programa de TE, sendo rejeitadas somente 15,98% dessas fêmeas. Das matrizes que apresentaram folículos ovarianos claramente identificáveis nos exames ginecológicos preliminares, 77,89% também foram aproveitadas no programa de TE, pela mesma razão, rejeitando-se apenas 22,11% do total. Não houve diferença entre os percentuais de fêmeas inseridas no programa devido à presença de CL (84,02%) ou folículo (77,89%) nos exames ginecológicos preliminares ($p > 0,05$). A construção do intervalo de confiança de 95% para a Razão de Possibilidades (*Odds Ratio*) apresentou valores entre 0,4001 e 1,1223, indicando que a presença de CL ou folículo maduro nos exames preliminares se equivalem como critérios de inclusão de matrizes em programas de TE (Tab. 1).

Dentro do grupo de animais selecionados por terem apresentado CL no exame ginecológico preliminar, foram analisadas distintamente as matrizes que possuíam CL no ovário direito e aquelas possuindo CL no ovário esquerdo. Nessa amostra, observou-se que 84,81% das matrizes que possuíam CL no ovário direito foram selecionadas para o programa de TE, desprezando-se apenas 15,19% delas. Percentuais similares (82,39%) foram constatados em matrizes aproveitadas por possuírem CL no ovário esquerdo, dentre as quais somente 17,61% foram

descartadas do processo. Não houve diferença entre os valores de 84,81% e 82,39%, indicando que não existiu distinção de funcionalidade entre os dois ovários, direito e esquerdo, como indicativos de atividade cíclica gonadal ($p > 0,05$; Tab. 1). Outros autores se reportaram ao assunto, afirmando que a frequência de ovulações no ovário direito é maior do que no ovário esquerdo (LEAL *et al.*, 2009), porém sem indícios de favorecimento ou prejuízo da localização do CL sobre a concepção (SCANAVEZ *et al.*, 2013).

De forma semelhante, entre os animais admitidos como receptoras potenciais porque possuíam folículo no ovário direito, 72,88% foram selecionadas, refugando-se o equivalente a 17,12%. As fêmeas que apresentaram folículo no ovário esquerdo perfizeram 86,11%, descartando-se apenas 13,89%. Não houve diferença entre os percentuais de aproveitamento de fêmeas com folículos no ovário direito ou esquerdo ($p > 0,05$). Tampouco houve diferença entre os ovários direito e esquerdo quando ambas as estruturas funcionais (CL e folículo) foram agrupadas, *id est*, 83,78% dos animais que apresentaram CL ou folículo no ovário direito foram incluídos no programa (sendo 16,22% rejeitadas), enquanto 82,79% dos animais com estruturas localizadas no ovário esquerdo foram aproveitadas para a TE (17,21% de refugos) ($p > 0,05$). Em todas as comparações entre ovários direito e esquerdo, específicas para CL, para folículo, ou agrupando-se ambas as estruturas, o cálculo da Razão de Possibilidades e seu intervalo de confiança de 95% revelaram que não há superioridade funcional de qualquer um dos lados (Tab. 1).

Das matrizes que haviam sido selecionadas para o programa de TE com base na presença de CL em um dos ovários, 33,38% apresentaram resultado positivo no DG realizado após a aplicação da biotécnica (66,62% apresentaram resultado negativo nesse exame). Dentre as fêmeas que haviam sido incluídas no o programa de TE a partir da identificação de folículos, 41,89% também demonstraram estarem prenhes por ocasião da realização do primeiro exame subsequente à transferência (58,11% não desenvolveram a gestação; $p > 0,05$). A análise da razão de possibilidades mostrou que não houve diferença entre as possibilidades de confirmação do estado gestacional associada aos achados do exame ginecológico inicial, para seleção de matrizes ($p > 0,05$). As fêmeas selecionadas por apresentarem folículos maduros como indicativos de ciclicidade ovariana, demonstraram apresentar resultados equivalentes àquelas que apresentaram CL,

quanto à capacidade de dar continuidade ao desenvolvimento intrauterino do conceito (Tab. 2).

A tabela 2 demonstra ainda que, de forma semelhante ao que aconteceu na primeira fase das análises de dados, o lado onde estava localizado o ovário não interferiu de forma significativa sobre a resposta positiva à TE, independentemente de estarem sendo comparados CLs, folículos, ou se as duas estruturas foram agrupadas como indicadores de ciclicidade, aplicada como critério para seleção de receptoras. Tais resultados estão de acordo com aqueles descritos anteriormente por Scanavez *et al.* (2013).

Tabela 2 - Percentual de matrizes apresentando resultado positivo de gestação por transferência de embriões de acordo com o tipo de estrutura encontrada no exame ginecológico preliminar (corpo lúteo ou folículo) e o lado em que o ovário estava localizado (direito ou esquerdo)

Estrutura	Percentual de prenhez	Nível de significância	Razão de possibilidades (Odds Ratio - OR)	IC _{95%} da OR
Corpo lúteo	33,38% (258/773)	0,1399 n.s.	1,4391	0,8857 – 2,3382
Folículo	41,89% (31/74)			
CLOD	31,62% (166/525)	0,1317 n.s.	1,2754	0,9293 – 1,7504
CLOE	37,10% (92/248)			
Folículo OD	37,21% (16/43)	0,3363 n.s.	1,5820	0,6196 – 4,0391
Folículo OE	48,39% (15/31)			
OD	32,04% (182/568)	0,0687 n.s.	1,3194	0,9786 – 1,7789
OE	38,35% (107/279)			

IC_{95%} = Intervalo de confiança da Razão de Possibilidades (OR) para nível de significância de 5%; CLOD = corpo lúteo no ovário direito; CLOE = corpo lúteo no ovário esquerdo; OD = Ovário direito; OE = Ovário esquerdo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Ainda que um bom percentual de matrizes tenha conseguido dar continuidade ao desenvolvimento embrionário e fetal logo após a aplicação da biotécnica da TE, somente o resultado final, sob a forma de parto a termo, indica de forma evidente que houve sucesso na adoção dos procedimentos. O percentual de vacas que apresentou parto a termo, entre aquelas que foram inicialmente selecionadas por apresentarem CL no exame ginecológico preliminar, foi de 76,74%. Somente 23,26% das fêmeas selecionadas com base na presença de CL e com DG inicial positivo, tiveram perda fetal ao longo do período gestacional e não produziram crias vivas. Um total de 87,10% das vacas que tinham DG inicialmente positivo, entre aquelas provenientes do grupo selecionado pela presença de folículo maduro em algum dos ovários, apresentaram parto a termo (apenas 13,90% tiveram perda

fetal posterior). Aquele valor de 76,74% não diferiu dos 87,10% de partos a termo observados naquelas vacas que haviam sido incluídas no programa de TE por apresentarem folículos maduros no exame ginecológico preliminar ($p > 0,05$). Nesse caso, o valor da Razão de Possibilidades foi calculado em 2,0455 e o seu intervalo de confiança para 95% foi na faixa de 0,6884 até 6,0781, confirmando que não houve diferença entre as vacas selecionadas com base na presença de CL ou folículo maduro no exame ginecológico preliminar.

Calculando-se o resultado final, na forma de partos a termo, de crias nascidas vivas, em relação ao número de transferências originalmente realizadas, verifica-se que houve 198 partos a termo de 773 transferências realizadas com receptoras selecionadas previamente devido à presença de CL em um dos ovários (25,61%). Por outro lado, aconteceram 27 partos a termo a partir de 74 transferências executadas em receptoras que possuíam folículos maduros por ocasião do exame prévio de aptidão (36,49%). Embora tenha havido diferença entre esses valores de 25,61% *versus* 36,49% ($p < 0,05$), esse resultado não deve ser compreendido como superioridade da seleção com base na presença de folículos maduros sobre a presença de CL na prática de campo, mas sim como indício de que os critérios se equivalem para a seleção de receptoras que deverão fazer parte de um programa de TE.

Usualmente, programas de TE têm início com a identificação de receptoras que estejam apresentando atividade cíclica gonadal, sendo esse considerado um indicador de que deverá responder satisfatoriamente aos procedimentos de sincronização de ciclo estral com as doadoras (GOUVEIA, 2011).

De modo geral, selecionam-se somente vacas possuindo CL, indicativo de ovulação anterior e determinante da utilização do animal. Entretanto, o critério de pré-seleção de receptoras baseado somente na presença de CL exclui animais que se encontram em fases do ciclo nas quais CL não são facilmente detectáveis. Reduz-se, desse modo, o número de fêmeas potencialmente utilizáveis na condição de receptoras, impactando negativamente os aspectos econômicos do uso desta biotécnica, por limitar a exploração maximizada dos componentes de custo do processo. Entre esses custos, destacam-se os honorários do profissional e demais membros da equipe executora, que necessitam ser bem aproveitados para que os resultados finais sejam economicamente compensadores (BELTRAME *et al.*, 2010). Contrariamente, a inclusão de matrizes que apresentam folículos maduros nos

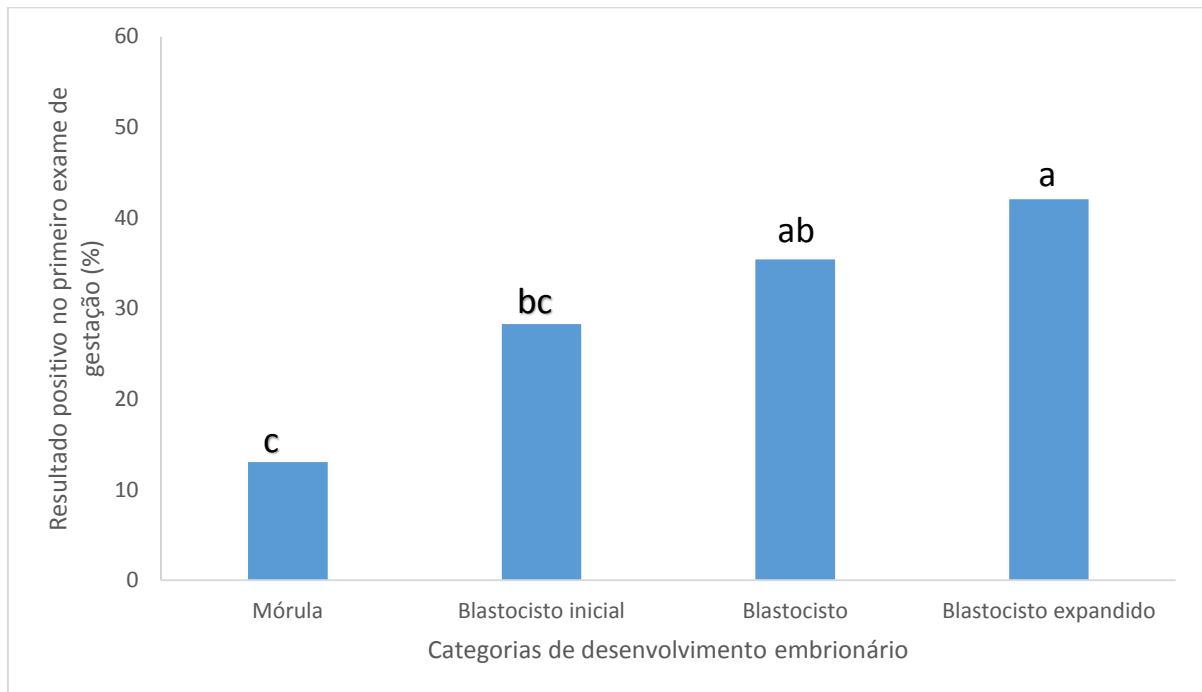
exames ginecológicos preliminares contribui para aumentar o número de receptoras disponíveis, permitindo um melhor aproveitamento dos recursos e reduzindo a necessidade da realização de procedimentos adicionais, como a criopreservação dos embriões produzidos em número excedente ao de receptoras.

Este estudo também procurou contemplar uma avaliação da qualidade (subjetiva) do CL sobre o resultado final do programa, sob a forma de nascimento dos produtos. Considerando três classes de CL, observou-se que os percentuais de gestações que resultaram em nascimento de crias viáveis não variaram significativamente quando comparados CL das classes I, II e III (86,67%, 77,39% e 74,19%, respectivamente), as quais foram numeradas em ordem decrescente de qualidade.

Tais achados confirmam os resultados da investigação feita por Vieira *et al.* (2002) a partir de 1.590 TEs realizadas em vacas da raça Simental em Minas Gerais. Essa semelhança nos achados pode ser explicada pelo fato de que a projeção do CL sobre a superfície ovariana não reflete necessariamente sua dimensão total (HONORATO *et al.*, 2013). Existem CL que apresentam pequena projeção superficial, mas que estão profundamente inseridos na estrutura interna do ovário. A recíproca também é verdadeira, p.ex., CL facilmente detectáveis a partir da projeção superficial podem não ter um grau elevado de internalização, apresentando dimensões totais reduzidas. Ademais, as concentrações de P4 não estão necessariamente relacionadas com a avaliação subjetiva de CL acessada por palpação transretal (VIEIRA *et al.*, 2002).

Compararam-se ainda resultados obtidos a partir do uso de embriões pertencentes a diferentes categorias de desenvolvimento, desde mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BI) e blastocisto expandido (Bx), quanto ao percentual de matrizes que apresentaram resultado positivo no exame após a transferência, e também quanto ao resultado final, na forma de parto a termo. Os resultados relativos ao efeito da classe de desenvolvimento embrionário sobre o resultado do primeiro exame gestacional se encontram sumarizados na Fig. 10.

Figura 10 - Resultados do primeiro exame para diagnóstico de gestação após a transferência de embriões, a partir de estruturas em diferentes fases de desenvolvimento



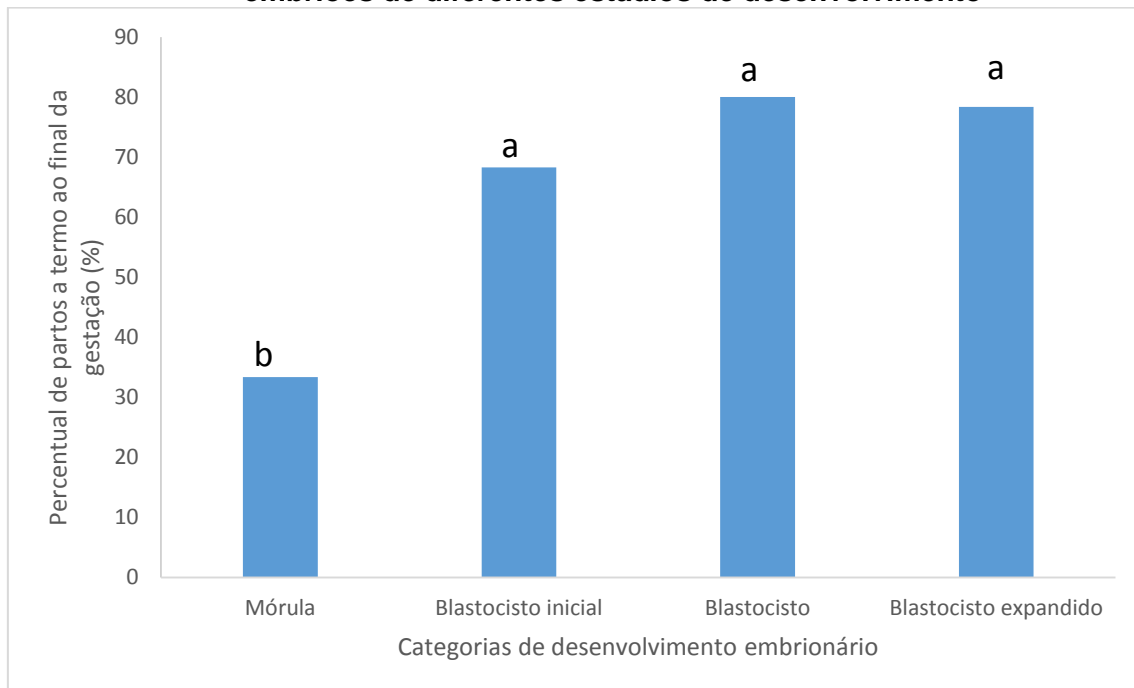
Fonte: Elaborada pelo autor.

Das matrizes que receberam embriões transferidos no estágio de mórula, 13,04% tiveram resultado positivo no primeiro DG realizado após a inováção. Dentre as que receberam embriões na condição de blastocisto inicial, 28,28% tiveram diagnóstico de gestação inicial positivo. Receptoras inovuladas com embriões nos estádios de blastocisto e blastocisto expandido tiveram as gestações confirmadas em 35,41% e 42,05% dos procedimentos realizados, respectivamente. Nas fases iniciais da prenhez, o percentual de diagnósticos positivos para inováção de embriões na forma de blastocisto expandido foi significativamente superior àqueles verificados nos embriões em estádios de mórula e blastocisto inicial. Não houve diferença entre os percentuais de prenhez resultantes da inováção de embriões nas fases de mórula e blastocisto inicial ($p > 0,05$); porém, os resultados obtidos com o uso de blastocistos plenamente caracterizados foram superiores aos de mórula ($p < 0,05$).

Ao fim do período gestacional, observou-se que apenas um dos três embriões que havia sido transferido em fase de mórula conseguiu se desenvolver satisfatoriamente e nascer a termo. O desempenho dos embriões transferidos como

blastocistos foi bastante superior. De 41 transferidos como blastocisto inicial, 28 se desenvolveram adequadamente e nasceram a termo (68,29%). Entre os 210 inovulados no estágio de blastocisto completamente caracterizado, 168 nasceram após um período gestacional normal (80,00%). Trinta e sete estruturas embrionárias foram transferidas na condição de blastocisto expandido, das quais 29 nasceram no prazo previsto, completamente desenvolvidas (78,38%). Não foram constatadas diferenças significativas nos percentuais de nascimentos resultantes de TE nas fases de blastocisto em suas distintas subdivisões de desenvolvimento (Fig. 11).

Figura 11 - Percentuais de partos a termos obtidos a partir de inovulações com embriões de diferentes estádios de desenvolvimento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando-se com os resultados disponíveis na literatura consultada, observa-se que Andrade *et al.* (2012) não encontraram diferença significativa devida à qualidade do embrião. Todavia, esses pesquisadores adotaram uma divisão em apenas duas classes (graus 1 e 2, correspondentes às condições descritas como “excelente” e “bom”, respectivamente). Ademais, o uso de embriões de apenas dois graus, e sendo ambos de qualidade elevada, pode ser parcialmente responsável pela equivalência entre as duas categorias.

Scanavez *et al.* (2013) também não observaram efeito significativo do grau de desenvolvimento do embrião sobre as taxas de prenhez e perdas

gestacionais, em estudo realizado com 1.100 TE em vacas mestiças euro-indianas leiteiras. Porém, esses autores classificaram os embriões de forma diferente daquela adotada no presente trabalho, agrupando-os como jovens (mórulas e blastocistos iniciais), intermediários (blastocistos típicos e expandidos) e adiantados (blastocistos em eclosão e eclodidos). Os tipos de sistemas de classificação podem, pelo menos em parte, explicar as razões para as diferenças existentes nos resultados experimentais.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

Matrizes que apresentam folículos maduros na ausência de corpo lúteo, por ocasião do exame ginecológico preliminar, de admissão no programa de transferência de embriões na condição de receptoras, podem apresentar resultados equivalentes aos daquelas admitidas pela presença de corpo lúteo no mesmo momento.

Não houve diferença no lado do ovário em que folículos ou corpos lúteos são encontrados, com respeito aos resultados finais da transferência de embriões.

Embriões em estágios de blastocisto devem ser prioritariamente selecionados para transferência, uma vez que apresentam maiores índices de nidação e desenvolvimento de prenhez, quando comparados aos outros estágios.

Conjuntamente, a partir dos achados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que o critério de seleção de receptoras proposto possibilita uma ampliação de aproximadamente 10% no número de fêmeas aproveitáveis para um programa de transferência de embriões, resultando em uma utilização dos recursos superior àquela permitida pelo critério usualmente empregado a campo, baseado somente na presença de corpo lúteo em algum dos dois ovários. Esse pode vir a ser um procedimento importante na viabilização econômica dessa biotécnica, uma vez que o pequeno número de receptoras aptas é considerado uma das principais causas da dificuldade de diluição dos custos fixos associados aos programas de TE em rebanhos leiteiros.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Joana D. et al. High concentrations of FSH-p on the in vitro maturation of *Bos indicus* oocytes. **Ciencia Rural**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.
- ANDRADE, G.A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- ARRUDA, R. P. et al. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro. **Animal Reproduction**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 345-53, 2012.
- AZAMBUJA, R.M. et al. Primeiras prenhez no Brasil em Nelore registrado. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, [S.l.], v.24, p.264, 1996.
- AZEVEDO, M. et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ Holandês-Zebu e lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.l.], v.34, n.6, p.2000-2008, 2005.
- BARUSSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v.31, n.2, p.205-211, 2007.
- BAVISTER, Barry D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**, [S.l.], v. 124, n. 2, p. 181-196, 2002.
- BELTRAME, R. T. et al. Simulação e análise econômica da produção in vivo e in vitro de embriões em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1513-1520, 2010.
- BLONDIN, P. et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 30-38, 2009.
- BÓ, G.A. et al. Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v.34, n.1, p.17-23, 2006.
- BOLS, P.E.J. et al. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, [S.l.], v.9, n.3, p.420-425, 2012.
- BONI, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. **Anim Reprod**, v. 9, n. 3, p. 362-369, 2012.
- BURATINI JR, J. Foliculogênese em bovinos. II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. **Animal reproduction**, [S.l.], v. 2, p. 55-62, 2006.
- CAMARGO, Luiz Sérgio de Almeida et al. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal reproduction**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

KLEIN, Bradley G. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. Elsevier Brasil, 2015.

DIAS, C. C.; ALVIN, M. T. T.; SALIBA, W. P.; VASCONCELOS, J. L.M. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 34, p. 412, 2006.

FERNANDES, C.A.C.; VELÁSQUEZ, L.F.U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Archivos de Reproducción Animal**, [S.l.], v.1, n.2, p.28-31, 1997

FIGUEREDO J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.195-226.

FLORENTINO, C.M. **Fatores que influenciam no sucesso da produção in vitro de embriões em receptoras bovinas criadas na região da Amazônia legal**. 2011. 84 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GARCIA, J. M., et al. Produção in vitro de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, [S.l.], v.26, p. 280, 1998, Suplemento.

GARCIA, J.; AVELINO, K.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied: 14-16 October 2004; Londrina, 2004, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. p.223-230.

Goncalves, PBD, Figueiredo, JR, Freitas, VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo:Varela, 2002. v.1.

GONÇALVES, P.B.D. *et al.* Produção in vitro de embriões. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal** [s.l: s.n.], 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 83 p.

GORDON, Ian. Laboratory production of cattle embryos. CABI, 2003.

GOUVEIA, F.F. **A produção in vitro de embriões bovinos**. 2011. 35 f. Monografia (Faculdade de Agronomia e Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília.

GRÁZIA, J. *et al* Desempenho de doadoras leiteiras mestiças F1 (Gir x Holandês) no sistema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v.68, n.3, p.605-610, 2016.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

- HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of pregnancy in cattle. **Rev. bras. reprod. anim**, [S.l.], n. supl. 3, pt. 1, p. 108-19, 1991.
- HONORATO, Marília Torres et al. Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET**, [S.l.], v. 7, p. 1870-1980, 2013.
- Perry, George. IETS 2015 statistics and data retrieval committee report, a publication of the International Embryo Technology Society, 2016.
- JONES, A.L.; LAMB, G.C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, [S.l.], v.69, p.107-115, 2008
- KAISER, G.; ALBERIO, R.; BRUN, D. S. Maturação in vitro de oócitos bovinos em criotubos e em estufa portátil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, [S.l.], v. 27, p. 241, 1999.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido**. [S.l.]: Artmed Editora, 2016.
- LEAL, L.S. *et al.* Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], v.10, p.174-183, 2009.
- LEHMKUHL, R.C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. et al. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, [S.l.], v.28, supl., p.276, 2000.
- LEIVAS, Fábio Gallas et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência rural**, Santa Maria. v.34, n.1, jan./fev. 2004, p.219-224, 2004.
- MACEDO, G. G. et al. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e o embrionário. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [S.l.], v. 38, p. 80-85, 2014.
- MARINHO, L. S. R. et al. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. **Animal Reproduction**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 323-28, 2012.
- MARQUES, M. O. et al. IATF: DESAFIOS E SOLUÇÕES PARA MAXIMIZAR A EFICIÊNCIA DA TÉCNICA. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 36, n. Supl 2, p. s155-s160, 2008.
- MEIRELLES, F.V. *et al.* Perspectivas para as 43 técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2008. p.195-205.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, [S.I.], v. 59, n. 1, p. 61-72, 2003.

MORAIS D.A.E.F. *et al.* Variação anual de hormônios tireoidianos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.I.], v.37, n.3, p.538-545, 2008.

OLIVIER, N.S.; PALMA, G.A.; ALBERTO, R. In vitro production of bovine embryos in water bath. **Theriogenology**, v.49, p.211, 1998.

PALHANO, H.B. **Reprodução em bovinos-fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora LF Livros, 2008, p.181-224.

PALMA, G.A.; OLIVIER, N.; ALBERIO, R.H. *et al.* In vitro development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. **Theriogenology**, [S.I.], v.49, p.213, 1998.

PARRA, B.C. *et al.* Aspecto sanitário na transferência de embriões de bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [S.I.], ano.6, n.10, p.7, 2008. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL08.pdf>>. Acesso em: 21 mai. 2017.

PEIXER, M. A. *et al.* Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargen. **Zootecnia**, [S.I.], v.32, p.49, 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, [S.I.], v.29, p.21-37, 1987.

PIETERSE, M. C. *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, [S.I.], v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.

PONTES, J.H.F. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, [S.I.], v.74, p.1349-1355, 2010.

REICHENBACH, H. *et al.* Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. Cap. 8, p.127-177.

REIS, A.R. *et al.* Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça HolsteinFriesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S.I.], v.43, n.5, 2006.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Veterinary Record**, [S.I.], v.135, p.452-457, 1994.

RODRIGUES, C. A. et al. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal reproduction science**, [S.l.], v. 118, n. 2-4, p. 110-117, 2010.

SAEKI, K., HOSHI, M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., et al. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biol Reprod**, [S.l.], v.44, p.256-260, 1991.

SAS INSTITUTE. The SAS system for windows. Release 9.2. 2002.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SEIDEL JR, G. E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, v. 105, n. 1-2, p. 129-138, 2008.

SENEDA, M.M. *et al.* Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.l.], v.23, n.1, p.101-110, 2002.

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

SENGER, P. L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Redmond, OR: Current Conceptions. 2012.

SILVA, R. G. Introdução à bioclimatologia animal. São Paulo: Nobel, 2000. 450p.

SILVA, R.G.; MORAIS, D.A.E.F.; GUILHERMINO, M.M. Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.l.], v.36, n.4, p.1192-1198 (supl.), 2007.

SILVA, L. K. X. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 63, n. 1, p. 74-80, 2011.

SPANO, A.A.; SILVA, A.A.M.R. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Ars Veterinaria**, [S.l.], v.8, p.131-141, 1992.

SPRECHER, D.J.; NEBEL, R.L; WHITMAN, S.S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, [S.l.], v.31, p.1165-1172, 1989.

STEVENSON, J.S.; KOBAYASHI, Y.; SHIPKA, M.P. et al. Altering conception of dairy cattle by gonadotropin-releasing hormone preceding luteolysis induced by prostaglandin F_{2α}. **J. Dairy Sci.**, [S.l.], v.79, p.402-410, 1996.

TESSMANN, J.V. Transporte-Maturação de oócitos bovinos em palhetas. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

THATCHER, W.W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, [S.l.], v.56, p.1435-1450, 2001.

TORRES JÚNIOR, J.R.S. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, [S.l.], v.69, p.155-166, 2008.

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

VASCONCELOS, José Luiz Moraes et al. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 192-200, 2006.

VIANA, J.H.M. **Avaliação ultrassonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. 1996. 120 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia do Departamento de Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

VIANA, J.H.M. et al. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v.51, n.3, p.251-256, 1999.

VIANA, J.H.M. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v.38, supl.2, p.661-674, 2010.

VIANA, J.H.M. et al. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, [S.l.], v.9, n.1, p.12-18, 2012.

VIEIRA, R.C. et al. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Bioscience Journal**, [S.l.], v.18, p.99-102, 2002.

VIZCARRA, VEL et al. Efeito do fluido folicular na manutenção de oócitos recém aspirados de bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, [S.l.], v. 28, n. sSuplemento, 2000.

WARD, F. A. et al. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, [S.l.], v.54, p.433-446, 2000.

WHEELER, Matthew B. et al. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 219-227, 2006.

XU, J.; CHAUBAL, S. A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 39-47, 2009.

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