

CHRISTIANE MEDEIROS FLORENTINO

FATORES QUE INFLUENCIAM NO SUCESSO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM RECEPTORAS BOVINAS CRIADAS NA REGIÃO DA AMAZÔNIA LEGAL

**RECIFE
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CHRISTIANE MEDEIROS FLORENTINO

FATORES QUE INFLUENCIAM NO SUCESSO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM RECEPTORAS BOVINAS CRIADAS NA REGIÃO DA AMAZÔNIA LEGAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Áurea Wischral.

**RECIFE
2011**

“Há homens que lutam um dia e são bons; Há outros que lutam um ano e são melhores; Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons; Porém há aqueles que lutam toda a vida; Esses são imprescindíveis.”

Bertold Brecht

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradecimento primordial não poderia deixar de ser Aquele, 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 que compartilharam os nossos ideais e os alimentaram, incentivando-nos a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos; a vocês que mesmo distantes mantiveram-se sempre ao nosso lado lutando conosco, dedicamos a nossa conquista com a mais profunda admiração e respeito. De vocês recebi o dom precioso do universo: a vida. Já por isso seria infinitamente grato. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável, consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam duro dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e o estudo um fardo pesado demais. 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: obrigada.

A minha avó Francisca pelo amor incondicional, pois agradeço a Deus a oportunidade de conviver e fazer parte desta família.

Aos meus irmãos Magda, João, Luciene, minha sobrinha Carol e Larissa, por contribuírem para minha evolução espiritual.

Não poderia também deixar de agradecer as minhas tias Cléia, Virginia, Rosa, Severina, meu tio Isac e meus primos Rafael e Rodrigo, pois nos momentos mais difíceis da minha vida me acolheram com muito carinho.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Áurea, pelo auxílio, disponibilidade de tempo, sempre com uma simpatia e paciência enorme.

A Doutora Tânia Vasconcelos Cavalcante, agradeço a sua amizade que, gentilmente, você me permitiu desfrutar. Agradeço sua energia que, positivamente, me ajudou a montar e concluir esta tese de doutorado. Agradeço sua força que bravamente, você consegue me emprestar. E agradeço ainda por ter acreditado na possibilidade da realização deste trabalho.

Aos amigos Juliano Franco, Fernando Brito Lopes, Elda Dias e Helciléia Santos pelo incentivo e contribuição para realização deste trabalho.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES QUE INFLUENCIAM NO SUCESSO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES EM RECEPTORAS BOVINAS CRIADAS NA REGIÃO DA AMAZÔNIA
LEGAL**

Tese de Doutorado elaborada por

CHRISTIANE MEDEIROS FLORENTINO

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Áurea Wischral
Orientadora – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Erika Christina Santos Oliveira
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Maria Bastos de Souza - DMFA/UFRPE
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dr^ª. Glenda Mônica Luna de Holanda - IPA
Instituto de Pesquisas Agronômicas

Prof^º. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu - DMV/UFRPE
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a eficiência da transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) em fêmeas bovinas na região da Amazônia Legal, foram realizados dois experimentos. No experimento I, embriões em diferentes estádios de desenvolvimento foram inovulados em receptoras com corpos lúteos de diferentes tipos, nos períodos chuvoso e seco. Foram avaliadas 5403 transferências com embriões PIV em seis estádios de desenvolvimento. Os oócitos foram obtidos de fêmeas zebuínas, por aspiração vaginal guiada por ultrassonografia, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Os embriões foram inovulados nos estádios de mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE), em receptoras mestiças cíclicas. Os corpos lúteos das receptoras foram classificados em protusos (CL1: >200mm, CL2: entre 160 a 200mm, CL3: entre 100 a 159mm) e inclusos (CL<150mm), por meio de ultrassonografia. Obteve-se 34,30% (1.855) de receptoras prenhes, com taxa de prenhez significativamente maior nos embriões em estágio de BX (38,2%). O resultado de BX apenas não diferiu significativamente do obtido em fêmeas inovuladas com embriões em estágio BN (35,9%) e BN não diferiu de MO, BI e BL ($P>0,05$). As análises demonstraram ausência de correlação entre o tamanho/tipo do corpo lúteo com desenvolvimento de embriões PIV inovulados nos diferentes estádios. Não foi evidenciada diferença estatística ($P>0,05$) entre períodos seco e chuvoso, com taxas de prenhez de 33,7% e 35,7%, respectivamente. No Experimento II, foi avaliado o tempo ótimo para inovulação de embriões com sete dias após PIV, em fêmeas bovinas, em função do momento do estro das receptoras, em períodos chuvoso e seco. Dentre as 2.234 receptoras bovinas inovuladas, 31 apresentaram estro dois dias antes (D-2) da fertilização *in vitro*, 473, um dia antes (D-1), 1.247, no mesmo dia (D0), 472 um dia após (D+1) e 11 receptoras apresentaram estro dois dias após (D+2) a fertilização *in vitro*. Das receptoras inovuladas, 35,27% apresentaram-se prenhes. Destas, 57,90% foram inovuladas no D0, enquanto que para os dias D-2, D-1, D+1 e D+2, os percentuais de fêmeas prenhes foram de 0,37%, 22,34%, 19,02% e 0,37%, respectivamente. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) entre as taxas de prenhez obtidas nos grupos de sincronização D-1, D-0 e D+1. Também não foram evidenciadas diferenças estatísticas ($P>0,05$) quanto à estação do ano em que foram realizadas as inovulações para sincronização D-1, D-0 e D+1. Os resultados de prenhez obtidos após inovulação com PIV na região da Amazônia Legal foram semelhantes aos estudos realizados em outras regiões, os quais

demonstraram não haver influencia do período do ano sobre as inovulações. Estes resultados reforçam a necessidade de se continuar a pesquisa em busca da solução dos problemas acerca do desenvolvimento do oócito para produção de embriões de qualidade, ampliando o conhecimento e dessa forma otimizando a utilização da PIV, o que possibilitará a difusão desta tecnologia visando o aumento da produtividade da pecuária nacional. Conclui-se que a sincronia de até ± 1 dia é melhor para o estabelecimento da prenhez obtida a partir de embriões PIV e que na Amazônia Legal a estação do ano não é fator limitante para a manutenção da gestação destes embriões.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate transfer efficiency in bovine embryos *in vitro* produced (IVP) in the Legally-defined Brazilian Amazon. In order to do so, two experiments were conducted. In Experiment I, embryos at different stages of development were inoulated in cows with different *corpus luteum* types, either in dry or rainy season. 5403 embryos transfers were evaluated, with IVP embryos at different stages of development. The oocytes were obtained from zebu females through vaginal aspiration guided by sonogram, matured, fertilized, and cultured in vitro. The embryos were inoulated in the stages of morula (MO), early blastocyst (BI), blastocyst (BL), expanded blastocyst (BX), blastocyst hatching (BN) and hatched blastocyst (EB) in cyclic crossbred cows. Corpus lutea were classified by ultrasonography in protruded (CL1:> 200mm, CL2: 160 to 200mm, CL3: 100 to 159mm) and included (CL <150 mm). 34.30% (1855) of the animals conceived, with significantly higher pregnancy rate of stage BX embryos (38.2%). The result of BX only did not differ significantly from that obtained in females inouladas with embryos stage BN (35.9%) and BN did not differ MO, BI and BL ($P>0.05$). The analyses showed no correlation between *corpus luteum* size or type and the development of IVP embryos inoulated at different stages. Pregnancy rates did not differ for inoulations performed in dry and rain season, with 33.7% and 35.7% mean respectively ($P>0.05$).

Experiment II aimed to evaluate optimal time for inoulation of bovine females with IVP embryos after seven days, as a function of estrus manifestation, either in dry or rainy season. Among 2234 inoulated receptors, Estrus manifestation was observed two days before (D-2) in 31 of the recipients, one day before (D-1) in 473, on the exact day (D-0) in 1.247, one day after (D+1) *in vitro* fertilization, in 472, respectively, and 11 of the animals revealed estrus behavior two days (D+2) after in vitro fertilization. 35.27% of all inoculated animals conceived. The pregnancy rate for D0 was 57.90%, , while for D-2, D-1, D+1 and D+2, such percentages were 0.37%, 22.34%, 19.02 and 0.37%, respectively. Considering pregnancy rates, no significant difference ($P>0.05$) was observed between D-1, D-0 and D+1, which also displayed no significant difference for synchronization to D-1, D-0 and D+1 in either seasons ($P>0.05$). The results obtained after embryo transfer with IVP from Amazon Region were similar to studies in other regions and not influenced by the season. These results show the need for continuous research in order to address oocyte development problems for the production of quality embryos, augmenting the knowledge in the area and optimizing the use

of IVP, which will ultimately enable the dissemination of this technology, and increase livestock production efficiency. Therefore, it can be concluded that a synchronism of ± 1 day interval from estrus manifestation is optimal for the achievement of pregnancy through *in vitro* fertilization, and that in the Legally-defined Brazilian Amazon, the season is not a limiting factor for the maintenance of successful pregnancies.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Tabela 1-** Percentagem de receptoras prenhes e vazias, após TE com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, produzidos e inovulados na região da Amazônia Legal 54
- Tabela 2 -** Estimativas de correlação de Spearman (r_s e valores de P) entre ovário (direito e esquerdo) e diâmetro de corpo lúteo (CL) das receptoras inovuladas e prenhes com embriões em diferentes estádios de desenvolvimento..... 55
- Tabela 3 -** Análise do efeito do período chuvoso e seco sobre o percentual de receptoras prenhes e vazias inovuladas com embriões PIV produzidos na região da Amazônia Legal..... 56
- Tabela 4-** Percentual de receptoras prenhes (n) inovuladas em período chuvoso e seco com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário na região da Amazônia Legal..... 56

Artigo 2

- Tabela 1 –** Percentual e quantidade (n) de receptoras bovinas mestiças prenhes e vazias inovuladas com embriões de 7 dias produzidos in vitro (PIV), em função do dia da manifestação do estro 73
- Tabela 2 –** Quantidade (prenhes/total) e percentual (%) de fêmeas prenhes relacionadas ao dia da FIV e após a detecção do Estro em função da estação do ano (chuvosa e seca) 74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise de regressão entre a taxa de prenhez e o dia da inovulação (dias da FIV) de receptoras em relação ao dia da detecção do estro	74
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Significado
BE	Blastocisto Eclodido
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BN	Blastocisto em Eclosão
BX	Blastocisto Expandido
BSA	Albumina Sérica Bovina
°C	Grau Celsius
CL	Corpo Lúteo
cm	Centímetro
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCO _s	Complexo <i>cumulus oophorus</i>
CO ₂	Gás Carbônico
ECC	Escore de Condição Corporal
EGF	Epidermal Growth Factor
eCG	Gonadotrofina Corônica Eqüina
E ₂	Estradiol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FD	Folículo Dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IFN τ	Interferon tau
IGF ₁	Insuline Growth Factor 1
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de Mercúrio
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
MO	Mórula

N ₂	Nitrogênio
NO	Oxido Nítrico
ng	Nanogramas
O ₂	Oxigênio
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PGF _{2α}	Prostaglandina F dois alfa
PIV	Produção <i>in vitro</i>
%	Porcentagem
P4	Progesterona
PVA	Álcool Polivinílico
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético do Oviduto
TE	Transferência de Embriões
TETF	Transferência de Embriões em Tempo Fixo
TR	Taxa de Recuperação
TALP	Tyrode Albumin Lactate Piruvate
TCM 199	Tissue Culture Medium 199

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	Aspectos Fisiológicos da Reprodução das Fêmeas Bovinas	20
3.1.1	Anatomia ovariana.....	20
3.1.2	Ciclo estral.....	21
3.1.3	Endocrinologia da reprodução.....	22
3.1.4	Dinâmica folicular.....	23
3.2	Produção <i>in vitro</i> e Inovação de Embriões Bovinos	25
3.2.1	Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU- <i>Ovum pick-up</i>).....	26
3.2.2	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	28
3.2.3	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	29
3.2.4	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	32
3.3	Aspectos Gerais sobre a Produção <i>in vitro</i> de Embriões	33
3.4	Aspectos Ambientais	37
4	REFERÊNCIAS	38
5	ARTIGOS CIENTÍFICOS	48
5.1	Taxa de prenhez em receptoras bovinas inovuladas com embriões produzidos <i>in vitro</i> (PIV) na Amazônia Legal	48
5.2	Influência do momento da inovação de embriões zebuínos produzidos <i>in vitro</i> sobre a taxa de prenhez na região da Amazônia Legal	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos, o rebanho brasileiro obteve um crescimento de 2,6%, mesmo com todos os problemas enfrentados pelo setor pecuário, como por exemplo, a crise internacional, os problemas sanitários e o aumento de áreas utilizadas pela agricultura. O Brasil detém 16,1% do rebanho mundial de bovinos, ou seja, um efetivo de 159,3 milhões de cabeças, e com isso ocupa um lugar de destaque no mercado mundial de carne. Desde 2003, se mantém como o maior exportador de carne no mundo, e assim deve estabelecer uma maior eficiência para atender esse mercado, bem como o mercado interno que está se tornando cada vez mais exigente (ANUALPEC, 2007).

Em um sistema de produção de bovinos de corte, a eficiência reprodutiva é o aspecto mais importante da atividade, por estar diretamente relacionada ao aumento na taxa de desfrute do rebanho. Muitos pecuaristas têm significativas perdas econômicas quando suas matrizes não produzem um bezerro por ano, em consequência de períodos de anestro prolongado (FERRAZ et al., 2008).

O atraso na concepção ou a não concepção podem causar o descarte de matrizes por falhas reprodutivas. Fêmeas zebuínas possuem um período de gestação de aproximadamente 290 dias (FIGUEIREDO et al., 1997) e, considerando-se o objetivo de se obter a desmama de um bezerro por ano, essas têm que estabelecer uma nova gestação dentro de no máximo 70 a 80 dias pós-parto. No intervalo parto-concepção, deve-se ainda descontar os dias em que está ocorrendo a involução uterina, que dura em média 40 dias (HAFEZ e HAFEZ, 2004), restando apenas algo em torno de 40 dias para que se estabeleça uma nova gestação.

As fêmeas bovinas, na puberdade, possuem em seus ovários cerca de 70.000 oócitos. No entanto, pelas vias naturais, apenas 0,01% de produtos viáveis podem ser gerados, ou seja, um número próximo a dez descendentes em toda vida reprodutiva (SENEDA et al., 2002). Assim, a utilização de biotecnologias da reprodução é alternativa para aumentar os índices reprodutivos de um rebanho bovino.

Muitas são as biotecnologias da reprodução disponíveis para a maximização dos índices reprodutivos, mas algumas, como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* de embriões (FIV), devido ao alto custo de implantação e necessidade de manejo específico e diferenciado, ficam restritas aos plantéis de elite, multiplicadores da melhor genética disponível (FERRAZ et al., 2008).

Nesse contexto, a transferência de embriões é uma das alternativas para melhorar o aproveitamento dos gametas de vacas e novilhas, e vem sendo utilizada com sucesso desde a década de 50, quando Willet et al. (1951) fizeram o primeiro relato de um produto nascido através dessa técnica. Pela TE, cada doadora pode multiplicar em mais de três vezes o número de descendentes de sua vida reprodutiva (SENEDA et al., 2002).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia da reprodução e apresenta um grande potencial para acelerar o melhoramento genético de um rebanho bovino, assim como é uma importante ferramenta de pesquisa para a embriologia animal. A utilização comercial dessa técnica tem aumentado e atualmente, bovinos PIV representam uma porcentagem considerável do número total de embriões de animais de produção do mundo todo. É uma técnica extremamente versátil, pois pode ser aplicada em doadoras de todas as idades e não interfere no estado fisiológico da doadora, pois nenhuma estimulação hormonal é exigida (GALLI et al., 2003). É uma ferramenta útil para multiplicação de animais superiores, apresenta-se como uma alternativa para transferência de embrião convencional, sendo utilizada comercialmente em vários países (CAMARGO et al., 2010). Assim essa biotécnica vem se tornando uma prática promissora, e, certamente, terá importante papel na aplicação comercial de programas de melhoramento genético (SERAPIÃO et al. 2005).

O primeiro bezerro nascido de FIV, a partir de um ovócito, cuja maturação foi realizada *in vitro*, ocorreu em 1981 (BRACKETT et al., 1982).

Na década de 90, Larocca et al. (1996) reportaram que a produção de embriões pela FIV tornou-se rotina de muitos países e, sua aplicação comercial, permite melhorar a eficiência reprodutiva e o avanço genético nos bovinos.

A expressão PIV de embriões é usada para designar um conjunto de procedimentos realizados em laboratório, incluindo etapas de maturação, fertilização e cultivo, pelos quais oócitos imaturos são utilizados para a produção de embriões. Até o final da década de 90, a PIV no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem expressão comercial. No entanto, esta técnica vem se tornando uma prática promissora, e, certamente, terá importante papel na aplicação comercial de programas de melhoramento genético (SERAPIÃO et al., 2005).

A produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica que se refere à interação do espermatozóide com o ovócito no laboratório, com a formação de um novo indivíduo, permitindo a aceleração da produção de animais geneticamente superiores. Envolve as etapas de colheita, maturação (MIV) e fertilização de oócitos (FIV) e ainda o cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. Assim a utilização de biotecnologias como transferência de

embriões e a sua produção *in vitro*, são alternativas que podem ser utilizadas comercialmente para a melhoria da eficiência reprodutiva concomitante ao progresso genético dos rebanhos bovinos na região Norte do Brasil.

Os programas de Fertilização *in vitro* (FIV) estabelecem um acelerado progresso genético através da multiplicação de animais geneticamente superiores. Porém, como qualquer outra ferramenta aplicada à pecuária, a FIV apresenta vantagens e algumas restrições a sua utilização. Além dos aspectos inerentes ao embrião, à doadora e ao ambiente, as variáveis relacionadas à receptora são de decisiva importância na taxa de gestação (ALVES et al., 2008).

O custo de manutenção de receptoras é um dos principais fatores que oneram um programa de transferência de embriões. Assim é necessário que essas sejam utilizadas de forma racional, e que exibam uma fertilidade ótima, para que a relação custo-benefício da técnica se situe dentro de uma faixa aceitável. São inúmeras as causas que influenciam a taxa de prenhez das receptoras, entre as quais, o grau de sincronia de estro dessas em relação ao da doadora, o ambiente uterino, assim como o metabolismo do embrião, que variam durante os estágios iniciais de desenvolvimento, havendo uma sintonia entre as condições do ambiente uterino, controlada principalmente pelos níveis de esteróides circulantes, e o metabolismo do embrião (FERNANDES e VIANA, 1996).

As características do embrião são algumas das principais variáveis envolvidas na taxa de gestação de receptoras. Tanto a qualidade das estruturas quanto o estágio de desenvolvimento, são citados como importantes neste contexto (FERNANDES e MAESTRI, 1996).

O Brasil é referência mundial em produção *in vitro* de embriões bovinos, com uma crescente demanda por profissionais habilitados nessa cadeia produtiva. Anualmente, são produzidos *in vitro* cerca de 140 mil embriões bovinos no país. Notadamente, observa-se a utilização dessa biotécnica na Amazônia Legal, um dos biomas mais complexos e ricos do mundo. A Amazônia Brasileira passou a ser chamada de Amazônia Legal, fruto de um conceito político e não de um imperativo geográfico, vinculado à necessidade do governo planejar e promover o desenvolvimento da região. Os Estados que compõem a Amazônia Legal são: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão (oeste do meridiano de 44°) (AMAZÔNIA LEGAL, 2010).

O clima na região da Amazônia Oriental se apresenta úmido sob a influência da baixa latitude, as temperaturas mantêm-se elevadas durante todos os meses do ano, possui altos

níveis de eficiência térmica durante todo o ano, razão pela qual é caracterizada por clima Megatérmico. As chuvas, apesar de regulares, não se distribuem igualmente durante o ano, o verão (junho a setembro) o período de maior índice pluviométrico, implicando em grandes excedentes hídricos e, conseqüentemente, com grandes escoamentos superficiais e cheias dos rios. No inverno e outono, ao contrário, observa-se o período menos chuvoso, resultando numa curta estação seca de um a três meses com pequenos déficits hídricos (AMAZÔNIA LEGAL, 2010).

Considerando todas as etapas que envolvem o processo, a movimentação financeira do setor chega a 71 milhões de reais por ano. Bem como é considerado que uma das mais importantes formas de validação dessa biotécnica se dê pelo nascimento de bezerros, justifica-se a realização deste estudo, uma vez que, a utilização dessa técnica, com resultados satisfatórios, ainda representa um desafio para os pesquisadores.

2. OBJETIVOS

- 2.1 Avaliar a eficiência da transferência de embriões bovinos, produzidos *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento, através das taxas de prenhez em receptoras bovinas inovuladas na região da Amazônia Legal.
- 2.2 Analisar a taxa de prenhez e determinar o tempo ótimo para inovulação de fêmeas bovinas, em função do momento do estro das receptoras, em períodos chuvoso e seco, na região da Amazônia Legal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Fisiológicos da Reprodução das Fêmeas Bovinas

3.1.1 Anatomia ovariana

Os ovários são órgãos pares do sistema reprodutor feminino, apresentam-se de tamanho e localização diferentes entre as espécies. Nos bovinos, os ovários têm em média 3,0 a 4,5 cm de comprimento, 1,5 a 2,0 cm de largura e 2,0 a 2,8 de espessura, apresentando coloração rósea clara devido à túnica albugínea (SISSON e GROSSMAN, 1981; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995; NASCIMENTO et al., 2003). É o órgão principal do sistema reprodutivo das fêmeas e exerce duas funções fisiológicas importantes, sendo responsável pela: 1) diferenciação e liberação do oócito maturo para posterior fecundação (função exócrina); 2) síntese de hormônios e diversos peptídeos (função endócrina) que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade e manutenção da gestação (BARNETT et al., 2006).

Os ovários são revestidos pelo epitélio superficial, contínuo com o mesovário. Sob o epitélio há uma cápsula de tecido conjuntivo denso – a *túnica albugínea*. Abaixo da albugínea, o ovário é formado por uma camada externa, o córtex (zona parenquimatosa), e uma camada interna, a medular (zona vascular). O córtex contém folículos, corpos lúteos e estroma com seus vasos sanguíneos e linfáticos. A medula é constituída por grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (RAMOS et al., 2008).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: *a*) folículos pré-antrais ou não cavitários e *b*) folículos antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos milhares de oócitos presentes em ovários mamíferos. Na categoria de folículos pré-antrais são incluídos os folículos primordiais, intermediários, primários e secundários. Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não chega até à ovulação, mas ao contrário, é eliminada por meio de um processo conhecido por atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 1997).

O corpo lúteo (CL) participa da maioria dos processos reprodutivos. Ele é um órgão endócrino transitório, formado pela ruptura do folículo ovulatório, e sua função primária é a produção de progesterona, a qual prepara o endométrio para implantação e manutenção da

gestação inicial. Se a prenhez não ocorrer, o CL regride para permitir o início de um novo ciclo estral (MILVAE et al., 1996; SAKAMOTO et al., 1995; MILVAE, 2000; WEBB et al., 2006).

3.1.2 Ciclo estral

As fêmeas bovinas são poliéstricas anuais, apresentando vários ciclos estrais ao longo do ano. Ciclo estral é o conjunto de fenômenos ocorridos entre dois episódios de estro (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Essa atividade cíclica depende de um complexo mecanismo, comandado pelo sistema nervoso central que exerce o controle do sistema reprodutivo (BINELLI et al., 2006). O ciclo estral resulta da interação coordenada dos tecidos do sistema nervoso central, hipotálamo-hipófise, ovário e útero. A comunicação entre esses órgãos ocorre principalmente mediante os hormônios GnRH (hipotálamo), LH e FSH (hipófise), estradiol e progesterona (ovário) e prostaglandina $F_{2\alpha}$ (útero) (GONZÁLEZ, 2001).

O ciclo estral varia de 17 a 25 dias, com intervalos médios de 20 dias para novilhas e 22 dias para vacas (SIROIS e FORTUNE, 1988), dividido em estágios que representam eventos comportamentais ou gonadais, a saber: proestro - período de desenvolvimento folicular; estro - período de receptividade sexual; metaestro – período de desenvolvimento inicial do corpo lúteo; diestro - período da fase madura do corpo lúteo (MARQUES et al., 2008).

Durante a fase de estro, as fêmeas apresentam manifestações comportamentais caracterizadas por imobilidade durante a monta, comportamento homossexual, descarga de muco vaginal, mugidos frequentes, intensa movimentação, aumento na frequência de micção, entre outras características que são usadas para a detecção convencional do estro (BARUSELLI et al., 2007). O comportamento de estro tem duração média de 12 horas e a ovulação ocorre de 12 a 16 horas após o término do cio. A duração do cio e o momento de ovulação apresentam pequenas variações entre fêmeas da mesma espécie, em função de fatores endógenos e exógenos. De forma mais ampla o ciclo estral pode ser dividido em duas fases distintas: fase folicular, caracterizada pelo desenvolvimento do folículo, culmina com a liberação do oócito (ovulação) e fase luteínica, caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo e produção de progesterona (VALLE, 1991).

As manipulações do ciclo estral em fêmeas bovinas são comumente utilizadas com estratégias farmacológicas, que consistem em protocolos de tratamentos hormonais, aplicados em uma seqüência pré-definida, visando um ou mais efeitos específicos, como por exemplo, controlar o recrutamento, a seleção, a ovulação ou a atresia folicular (BINELLI et al., 2006),

permitindo a interferência na sequência cronológica natural das ondas dentro de um ciclo e das fases dentro de cada onda de crescimento folicular, com finalidade prática de manipular a transferência de embriões em tempo fixo (BÓ et al., 2002).

3.1.3 Endocrinologia da reprodução

A fisiologia do ciclo estral é dependente da perfeita interação entre o sistema nervoso central, sistema endócrino e os órgãos genitais, útero e ovário (BALLe PETERS, 2006). Após a puberdade, a fêmea desenvolve um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem alterações morfológicas no sistema reprodutor e mudanças comportamentais no animal.

Segundo Baruselli et al. (2007), o hipotálamo é responsável pela produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atua na hipófise anterior provocando a liberação dos hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O primeiro promove crescimento folicular e hiperplasia nas células da granulosa e teca interna nos ovários, e o segundo induz a maturação e ovulação dos folículos, produção de estrógenos pela teca interna e luteinização desta e da granulosa, promovendo o desenvolvimento do corpo lúteo (RUMPF et al., 2000).

O 17β estradiol é produzido pelas células dos folículos ovarianos e é o principal hormônio estrogênico da fêmea. É liberado sob o controle do FSH e do LH. Quando produzido na presença do folículo dominante, é o responsável pela retroalimentação positiva ao LH e negativa ao FSH. Na ausência de progesterona, induz o pico pré-ovulatório de LH e também o comportamento do estro (FERRAZ et al., 2008).

De acordo com HAFEZ e HAFEZ (2004) a progesterona (P4) é um hormônio imprescindível para a regulação do funcionamento do sistema reprodutor feminino e, é produzida principalmente pelo CL sendo esse proveniente da reorganização das células foliculares após o processo ovulatório, atuando sinergicamente com os estrógenos em diversas funções fisiológicas. Elevados níveis de progesterona inibem o estro e a onda ovulatória de LH, estabelecendo assim a importância desse hormônio na regulação do ciclo estral.

A prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) é um hormônio luteolítico, produzido pelas células do endométrio uterino que controla o tempo de duração do CL, que por sua vez regula o comprimento do ciclo estral (OKUDA et al., 2002; BERTAN et al., 2006). A $PGF_{2\alpha}$ é que inicia a regressão do corpo lúteo e quando ocorre a fecundação, o embrião sinaliza ao endométrio, impedindo a liberação de prostaglandina e promovendo a regressão do corpo lúteo (HAFEZ e

HAFEZ, 2004). O ácido araquidônico e o ácido linoléico são quem regulam a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (THATCHER et al., 1997).

3.1.4 Dinâmica folicular

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001).

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, maturação oocitária e produção de hormônios (CORTVRINDT e SMITZ, 2001; SANTOS et al., 2008).

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (MARTINS et al., 2008). Em todas as fêmeas de mamíferos, a reserva de oócitos é estabelecida durante a vida fetal, sendo gradualmente mobilizada durante a vida reprodutiva (VIANA; BOLS, 2005)

Os folículos pré-antrais representam mais de 90% da população folicular ovariana e são classificados com base no número de camadas de células da granulosa circundando o oócito, em unilaminares (primordiais e primários) e multilaminares (secundários). Encontram-se em estágio de quiescência e são compostos de um oócito imaturo circundado por uma única camada de células da granulosa de forma pavimentosa. Os primários são constituídos de um oócito em crescimento circundado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide, não possuindo células tecais diferenciadas e podendo apresentar uma zona pelúcida em formação (SANTOS et al., 2008).

Os folículos secundários são caracterizados por um oócito inteiramente circundado por uma zona pelúcida e a presença de pelo menos duas camadas de células da granulosa de forma cubóide. Ao contrário dos folículos primordiais, os folículos primários e secundários são considerados folículos em estágio inicial de crescimento (SANTOS et al., 2008).

Os folículos antrais compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Nos folículos terciários o oócito está circundado pela corona radiata e células do *cumulus*, que o conectam às células da granulosa e células tecais e existe uma cavidade contendo líquido folicular. Já os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os

componentes presentes nos folículos terciários, porém o oócito está maturo e no estágio final do desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2008).

De toda a população folicular presente no ovário, apenas cerca de 0,1% atingirá a ovulação e os demais folículos serão “perdidos” via atresia durante o desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2008).

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* de reserva para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e pré-ovulatório). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais, bem como os mecanismos envolvidos na variação do período de início do crescimento folicular são ainda enigmáticos e representam uma das maiores questões relacionadas com a biologia ovariana (VIANA, BOLS, 2005; MARTINS et al., 2008).

O folículo dominante (FD) de uma onda tem dois destinos possíveis: na presença de P4, o FD entra em regressão ou atresia ou, após a luteólise, o FD escapa à atresia e ovula. Se não houver fertilização do ovócito ovulado, o ciclo se repetirá. Em uma determinada onda, cada fase de crescimento folicular é controlada por mecanismos específicos. O início de uma onda de crescimento folicular depende do término da onda que a precedeu (ADAMS et al., 1992; BINELLI et al., 2006).

Com a atresia ou ovulação do FD anterior, concentrações plasmáticas de inibina e estradiol-17 β (E₂) são reduzidas, resultando na liberação de um pico de FSH pela hipófise anterior e no recrutamento de uma nova onda (ADAMS et al., 1992). Conforme os folículos vão crescendo, aumenta sua capacidade de produção de E₂ e inibina, que suprimem gradualmente a liberação de FSH (GIBBONS et al., 1997).

As concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atresia. A seleção folicular é o ajuste do número de folículos recrutados para o número de folículos ovulados normalmente, em um ciclo estral, por uma determinada espécie, ou seja, um no caso dos bovinos. Assim, dentre os folículos recrutados em cada onda, apenas um é selecionado por conseguir continuar a crescer sob concentrações limitantes de FSH (BINELLI et al., 2006).

Pode-se definir a seleção como momento do “desvio” folicular, que é o momento no qual o folículo selecionado passa a ter uma taxa de crescimento maior que a dos outros folículos recrutados na mesma onda (GINTHER et al., 2001). Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a

capacidade de responder ao estímulo provindo do LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2010).

Em resposta ao LH, o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir E_2 e inibina aumenta. Tal fato leva as concentrações de FSH ao nadir e o folículo selecionado se torna dominante. A taxa de crescimento do FD é maior quanto maior for a frequência de pulsos de LH, sendo que esta é controlada diretamente pelo GnRH. A frequência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, de LH é inversamente proporcional às concentrações de P_4 circulante (BINELLI et al., 2006).

Durante a fase luteínica do ciclo estral, a frequência de pulsos de LH é insuficiente para estimular a diferenciação final e ovulação do FD. Ao entrar em atresia o FD perde a dominância e ocorre recrutamento de uma nova onda, como mencionado acima. Alternativamente, na fase folicular do ciclo, com a ausência de P_4 ocorre aumento na frequência de pulsos de LH, que estimula a liberação de quantidades crescentes de E_2 pelo FD. O E_2 induz mudanças de comportamento associadas ao estro e a liberação de um pico pré-ovulatório de GnRH, seguido por um pico de liberação de LH que causa a ovulação do FD (BINELLI et al., 2006).

O controle fisiológico do recrutamento, seleção, crescimento, dominância e atresia de folículos ovarianos ainda não está definitivamente entendido em bovinos. Com o uso da ultrassonografia, os estudos têm progredido rapidamente e resultados mais confiáveis e esclarecedores têm sido obtidos, tornando-se esse método o ideal para monitoramento do desenvolvimento folicular (GRADELA et. al, 2000).

Variações significativas no número de folículos em desenvolvimento nos ovários são relatadas entre indivíduos e entre raças. A reserva ovariana poderia ser a chave para explicar diferenças nos resultados de TE/FIV obtidos em determinados grupamentos genéticos. Entretanto, em animais em produção esta relação pode ser obscurecida por diferentes fatores que interferem no processo de recrutamento folicular, como balanço metabólico, condição corporal, condições ambientais, etc. (VIANA e BOLS, 2005).

3.2 Produção *In Vitro* e Inovulação de Embriões Bovinos

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma importante biotécnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos de interesse econômico, que pode ser utilizada, alternativamente para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir

pela forma natural ou via transferência de embriões. A PIV é uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) *in vitro* de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação, visando a obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo da fêmea (GONÇALVES et al., 2007).

O nascimento do primeiro bezerro, produzido totalmente *in vitro*, despertou o interesse de vários laboratórios mundiais para a produção *in vitro* de embriões (PIV). Por meio desta biotecnologia, pode-se obter uma produção média de uma gestação por vaca/ano, o que permite uma rápida multiplicação de genótipos superiores previamente selecionados, uma diminuição no intervalo entre gerações, propiciando uma maior intensidade de seleção. Estima-se que a PIV possa aumentar o ganho genético anual acima de 10%, quando aplicada apropriadamente, principalmente pela possibilidade de cruzamentos fatoriais, diminuindo a taxa de consangüinidade, bem como pela utilização de fêmeas pré-púberes. Além disso, com a PIV pode-se ter uma produção maciça de animais mestiços, possibilitando a manutenção de rebanhos com o grau de sangue desejado, o que é impossível com o uso da monta natural e inseminação artificial (SERAPIÃO, 2007)

Essa técnica pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes e com problemas de infertilidade adquiridos (TERVIT, 1996; GOODHAND et al., 1999; MALARD et al., 1999; TANEJA et al., 2000).

3.2.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU - *Ovum pick up*)

A aspiração folicular *in vivo* ou OPU (*ovum pick up*) e o aprimoramento das condições de cultivo tornaram viável a aplicação da PIV de embriões em escala comercial (GALLI et al. 2000; GONÇALVES et al., 2002).

A técnica de aspiração folicular orientada por ultra-sonografia (OPU) foi desenvolvida na década de 80, para coletar o complexo do *cumulus-oophorum* (CCO) de forma menos traumática que as abordagens cirúrgicas ou laparoscópicas até então utilizadas. Dentre as vantagens reconhecidas deste procedimento, está o fato de ser pouco invasiva, não depender de pré-estimulação hormonal, e poder ser usada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial (VIANA e BOLS, 2005).

A OPU também pode ser utilizada em animais muito jovens, a partir de dois a 3 meses, ou muito velhos, em vacas secas, em lactação ou prenhes. Não interfere no estado fisiológico do animal, podendo ser executada duas vezes por semana (GALLI et al., 2000).

Permite gerar produtos adicionais de uma vaca de alto valor que não responda mais aos tratamentos utilizados nas coletas de embriões (TE), ou que apresente infertilidade adquirida devido a patologias no trato reprodutivo, impossibilitando a fecundação e o desenvolvimento embrionário *in vivo* (BOLS et al., 2005).

A taxa de blastocistos obtidos com PIV gira em torno de 20 a 50% (média de 50%) pois cada fêmea bovina é capaz de produzir 50 a 100 embriões/ano, em regime de duas punções semanais, durante vários meses. Ainda que satisfatórios, esses resultados estão abaixo do que a técnica é capaz de fornecer. Uma melhor eficiência da PIV está condicionada ao desenvolvimento de pesquisas que visem aperfeiçoar e simplificar as condições em cultivo durante as diversas etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação *in vitro* de oócitos. Outra limitação é a distância entre o laboratório e as fazendas onde os oócitos são coletados e os embriões transferidos (GONÇALVES et al., 2002). Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* são de baixa qualidade, vulneráveis ao estresse térmico e oxidativo, por serem constantemente submetidos ao transporte em longa distância, diminuindo a taxa de eclosão e, conseqüentemente, gerando baixas taxas de concepção (PUPULIM et al., 2010).

Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da PIV. O tamanho do folículo de origem e a extensão e integridade das células do *cumulus* influenciam a competência oocitária. Folículos maiores (6mm) contêm oócitos com maior potencial para tornarem-se blastocisto, enquanto folículos pequenos (<3mm) contêm oócitos incompetentes. Os oócitos recuperados sem estimulação da doadora e com frequência de punção de uma vez/semana têm qualidade inferior aos oócitos coletados duas vezes/semana. Em doadoras gonadotropina-estimuladas, punções foliculares realizadas uma vez por semana são mais eficientes que aquelas realizadas em intervalos menores (duas vezes/semana), sendo tão eficientes quanto aquelas realizadas em regime de duas punções semanais sem estimulação prévia (RAMOS et al., 2006).

No entanto, quando a OPU é realizada em um programa comercial de PIV, usualmente todos os folículos são puncionados para maximizar o rendimento de oócito obtidos. O método de recuperação tem claramente um impacto na morfologia do CCOs e subsequentemente na capacidade de desenvolvimento *in vitro*. A importância das células do *cumulus* estarem intactas para a maturação oocitária e para o desenvolvimento *in vitro*, não deve ser subestimada. Oócitos desnudos apresentam uma taxa de fertilização significativamente menor quando comparadas a CCOs com *cumulus* denso, os quais geram as mais altas taxas de

clivagem. Quanto menos compactadas forem as células do *cumulus*, mais irregular o citoplasma, menor a qualidade e menores as taxas de clivagem (BOLS et. al., 2005).

A taxa de sucesso da OPU é medida parcialmente pela taxa de recuperação (TR = número de oócitos a cada 100 folículos puncionados), que é influenciada, entre outros fatores, pela visualização dos folículos, pelo diâmetro da agulha, o nível do vácuo da aspiração e pela experiência do operador. Como resultado, as taxas de recuperação variam entre 7% e 69,6%, nos diferentes grupos de pesquisa. Recentes avanços na tecnologia de ultrassom têm aumentado a resolução de imagem e a qualidade da visualização dos ovários (BOLS et. al., 2005).

Para a execução da OPU, é essencial uma agulha bem afiada. Para isso, atualmente foi adaptado o uso de agulhas hipodérmicas combinadas à uma probe setorial de angulação múltipla. As mais altas TR foram obtidas com agulhas mais largas (18 G), independente da pressão de vácuo utilizada, enquanto outros estudos demonstraram a recuperação de um maior número de oócitos (média de 75%) utilizando-se um vácuo de aspiração mais forte. A porcentagem de recuperação de CCOs intactos diminuiu progressivamente assim que o vácuo de aspiração aumentou, sendo associado a um aumento consistente no número de oócitos desnudos obtidos (BOLS et. al., 2005).

Baixas pressões, como 50 mmHg são pouco eficientes para a aspiração, enquanto que pressões maiores como 120 mmHg danificam o revestimento do *cumulus oophorus*. Para quantificar a pressão negativa de forma mais real, mensura-se o vácuo em volume de água por minuto. Mesmo assim, há variações consideráveis, de 4,4 a 40 mL de água/minuto (SENEDA et al., 2002).

3.2.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Para que o oócito seja capaz de ser fecundado e posteriormente se desenvolver até estágio de blastocisto, é necessário ser maturado e, durante essa fase, sofrer diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto no núcleo. Durante seu desenvolvimento, o oócito encontra-se no estágio de diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa. *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, a retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear. A maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II. *In*

vitro, diferentes condições de cultivo e protocolos foram testados para a maturação de oócitos (GONÇALVES et al., 2007).

O transporte dos oócito após a coleta deve ser realizado em um período de aproximadamente 10 a 12 horas (GONÇALVES et al., 2002). A MIV inicia-se com a chegada dos oócitos aspirados ao laboratório, mantidos em um meio de maturação. O período necessário para a maturação nuclear varia entre as espécies, onde para a espécie bovina a maturação nuclear do oócito requer um período de 18 a 22 horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O meio de cultura utilizado para a MIV é o TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) acrescido de 10% de soro bovino, FSH, LH, estradiol e EGF. A maturação é feita dentro de incubadoras convencionais de CO₂ no interior de placas de Petri (GALLI et al., 2000). A MIV de bovinos é realizada a 39°C, em atmosfera a 5% de CO₂ e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2002).

Mesmo ocorrendo uma seleção rigorosa de oócitos, a taxa de produção de embriões viáveis é menor em ovócitos maturados *in vitro* do que naqueles produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002), sugerindo que a maturação ainda é um fator limitante na PIV, e que apesar de milhares de bezerros terem sido produzidos a partir de ovócitos imaturos em bovinos, os eventos fisiológicos que ocorrem durante a maturação não são ainda completamente estabelecidos (WEBB et al., 2006).

3.2.3 Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização é um evento único, na qual a interação entre dois tipos de células da mesma espécie leva a uma cascata de eventos, que resultam na produção de um novo indivíduo. Neste processo está envolvida uma série de transformações organizadas que envolvem mecanismos da capacitação espermática, reconhecimento da espécie, passagem do espermatozóide pelos revestimentos oocitários, maturação oocitária, penetração do espermatozóide no citoplasma materno, para que finalmente ocorra a ativação do processo intracelular que leva à embriogênese (GABALDI et al., 2002).

O processo de FIV requer uma prévia preparação dos espermatozóides para se tornarem capacitados a realizarem a fertilização. Para que o espermatozóide tenha capacidade fecundante, precisa sofrer modificações funcionais durante a exposição às secreções do trato reprodutor feminino. Os espermatozóides encontrados no epidídimo, envasados em palhetas ou mesmo recém ejaculados não possuem potencial fecundante, então para adquiri-lo, os

espermatozóides devem sofrer alterações funcionais e estruturais, processo denominado capacitação espermática que torna o gameta maduro e viável (HYTTEL et al., 1997).

No processo de capacitação estão envolvidas mudanças bioquímicas e estruturais, como a remoção dos fatores decapitantes presentes no plasma seminal, basicamente proteínas e outras substâncias que recobrem a membrana do espermatozóide. O meio utilizado para promover a capacitação *in vitro*, deve aproximar-se das características do fluido presente na tuba. É necessário que contenha substratos energéticos tais como o piruvato, lactato, glicose, cálcio, além de concentrações baixas de potássio e fisiológicas de sódio. Algumas substâncias como bicarbonato, albumina e os glicosaminoglicos (heparina) ainda desempenhariam importante papel de desencadeadores do processo de capacitação espermática (ANDREOTTI, 2007).

A técnica utilizada para a separação dos espermatozóides vivos dos demais componentes do sêmen e dos constituintes do meio crioprotetor é o gradiente de Percoll. O fundamento desta técnica é recuperar a maioria dos espermatozóides móveis, sem alterações espermáticas e remover os mortos e outras células incluindo ainda substâncias tóxicas, além de permitir o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (GONÇALVES et al., 2002).

O meio TALP (Tyrode Albumin Lactate Pyruvate) é geralmente usado, suplementado com heparina e penicilina, hipotaurina e epinefrina (PHE) em 5% de CO₂ e 20% de O₂. Foi demonstrada que o nível de oxigênio durante a FIV e a adição de aminoácido ao meio de cultura podem ter um efeito positivo em taxas da fecundação e no desenvolvimento do embrião. Dados mostram que abaixar o nível do oxigênio a 5% durante FIV melhora a habilidade da fertilização de espermatozóides bovinos. Utiliza-se uma concentração de espermatozóides variando entre 0,1 e 2 milhões de espermatozóides/mL e 1 µg /mL de heparina no meio do SOF (Synthetic Oviductal Fluid), suplementada com aminoácidos, em 5% de CO₂, e em 5% de O₂. O sêmen é separado geralmente em um gradiente de Percoll a 45-90% para assegurar uma recuperação máxima da fração móvel de espermatozóides (GALLI et al. 2000).

Terminada a etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Após a preparação dos espermatozóides, retira-se da estufa a placa de Petri contendo os ovócitos maturados e inicia-se a fertilização sempre procurando proporcionar um ambiente adequado (GONÇALVES et al., 2007). O dia da fertilização *in vitro* é considerado como o dia zero (D0).

A fusão do oócito com o espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do espermatozóide e a membrana plasmática do oócito. Após a penetração espermática, ocorre a segunda divisão meiótica e os cromossomos do oócito são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino. De forma concomitante, a membrana nuclear do espermatozóide se desintegra, a cromatina nuclear descondensa pela remoção de proteínas nucleares espermáticas específicas e ocorre a formação de nova membrana nuclear que envolve os cromossomos paternos, formando o pró-núcleo masculino (GONÇALVES et. al., 2002).

No oócito competente há dois mecanismos de bloqueio para assegurar a fecundação por um único espermatozóide. O primeiro ocorre pela despolarização da membrana plasmática oocitária causada pela fusão do primeiro espermatozóide, prevenindo temporariamente a penetração de outros. O segundo bloqueio à polispermia, que é o mais importante em mamíferos, se dá pela extrusão dos grânulos corticais, constituindo-se de um evento permanente e causado por ondas de cálcio. A elevação da concentração do cálcio intracelular induz a fusão da membrana dos grânulos corticais com o ooplasma e o conteúdo dos grânulos corticais é liberado para o espaço perivitelino. As enzimas liberadas causam alterações moleculares na zona pelúcida que fica mais enrijecida evitando a entrada de mais espermatozóides (reação cortical) (SUN et al., 2003).

Vale ressaltar que o uso da análise da clivagem e desenvolvimento embrionário horas após FIV, apesar de serem métodos muito comuns em diversos laboratórios, não indica a qualidade embrionária e sua capacidade de implantação para seguir uma gestação normal. Sendo necessário um melhor entendimento sobre o desenvolvimento embrionário, com marcadores mais específicos das condições celulares e qualidade destes embriões (DODE, 2006).

Após a penetração no oócito, o espermatozóide inicia uma série de eventos envolvendo os componentes nucleares e citoplasmáticos de ambos os gametas. Ocorre a descondensação da cabeça, a formação do envelope nuclear e do pró-núcleo masculino. Concomitantemente, o oócito retoma a meiose, expulsa o segundo corpúsculo polar e forma o pró-núcleo feminino. Após a formação dos pró-núcleos, esses se aproximam e ocorre a singamia e a formação do novo indivíduo com início das divisões mitóticas (SARTORI e DODE, 2008).

3.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

O tempo de CIV varia de 8 a 10 dias após a FIV, em temperatura de 38,8°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

É necessário o uso de meios simples de cultura que suportem a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. A composição do meio é baseada nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação. O fluido de oviduto sintético é composto por secreções das células epiteliais, a partir da difusão de nutrientes do plasma. O potássio e o cloro estão presentes no fluido de oviduto em concentrações mais elevadas do que nas do plasma, enquanto o nível de cálcio é mais baixo e o de sódio e magnésio é similar ao do soro (GONÇALVES et. al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado a utilização com sucesso de meios definidos de cultura, adicionando o álcool polivinílico (PVA) em substituição a albumina sérica bovina (BSA), e assim evitando a aderência dos embriões e as substâncias não conhecidas do BSA. No entanto, embriões cultivados em meios totalmente definidos, normalmente sofrem bloqueio no desenvolvimento e redução da viabilidade em relação àqueles cultivados em meios suplementados com BSA e soro fetal bovino (SFB) (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996). Outros estudos demonstraram que a substituição de SFB e BSA por PVA proporciona baixo desenvolvimento embrionário, particularmente no estágio de blastocisto, sugerindo que o desenvolvimento de mórula para blastocisto exige fatores adicionais exógenos que podem ser encontrados no SFB, que provavelmente estimulam a diferenciação e a proliferação celular (LIM et al., 1999).

Parece que a albumina exerce importante papel com relação à nutrição do embrião em desenvolvimento, especialmente pós-compactação. Blastocistos derivados de meio suplementado com PVA possuem perfil metabólico alterado quando comparados com embriões cultivados na presença de albumina ou produzidos *in vivo*. A formulação de qualquer sistema de cultivo em condições definidas deve ser capaz de suprir o embrião com todos os seus requerimentos fisiológicos (THOMPSON, 2000).

No decorrer do desenvolvimento embrionário, o zigoto, contendo uma célula de grande volume se divide em numerosas células nucleadas de menor tamanho até a formação do blastocisto, resultando em um conjunto de células denominadas de blastômeros. Nos animais domésticos ainda ocorre o fenômeno de compactação de blastômeros, os quais parecem perder suas identidades e formar uma única massa celular. O fenômeno da

compactação cria circunstâncias que induzem a primeira diferenciação em mamíferos, que é a formação do trofoblasto e do embrioblasto. A formação da blastocele, cavidade do blastocisto, é uma etapa que acontece após a compactação do embrião (mórula compacta). Para a formação da blastocele é necessário haver acúmulo de fluido que passa através das células do trofoblasto, no interior do embrião. Após a formação da blastocele, ocorre a expansão do blastocisto, tanto em consequência do contínuo acúmulo de fluido quanto em decorrência de divisão celular (GONÇALVES et al., 2002).

A velocidade de clivagem e de desenvolvimento embrionário é considerada um indicativo de qualidade do embrião. Embriões de desenvolvimento mais rápido resistem melhor às agressões do ambiente, resultam em maior taxa de prenhez e mais bezerras a termo do que aqueles mais lentos (VAN SOOM et al., 1997).

A classificação dos embriões, quanto ao desenvolvimento e aspectos morfológicos, seguem critérios propostos pela Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). São classificados em Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto Expandido (BX), Blastocisto em eclosão (BN) e Blastocisto Eclodido (BE), conforme preconiza a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

O cultivo de embriões em estágio de pré-implantação desempenha um papel crucial tanto em embriologia humana quanto em animais domésticos. Durante os últimos 30 anos, um avanço considerável foi alcançado neste campo. O desenvolvimento foi mais intenso na década de 90 do século passado em animais domésticos e, na primeira década do novo milênio, em seres humanos. Devido ao último avanço, o cultivo prolongado de embriões e a transferência de um único blastocisto agora é o método preferido para diminuir as chances de prenhez múltipla, preservando a eficiência global do tratamento. No entanto, ainda existem várias perguntas a serem respondidas e uma série de possibilidades para melhorar a eficiência do cultivo embrionário *in vitro* de mamíferos (VAJTA, 2010).

3.3 Aspectos Gerais sobre a Produção *In Vitro* de Embriões

Tem sido amplamente pesquisada, a produção *in vitro* de embriões como forma de compreender os acontecimentos durante o desenvolvimento embrionário normal *in vivo* em bovinos, como meio para alcançar outras tecnologias, como exemplo a transgênese nuclear. Existem desafios associados à tecnologia PIV, que já existem ou são derivados do fato de que

a origem dos oócitos utilizados (estágio do ciclo estral, estágio da onda folicular e outros) é desconhecida e, portanto, a qualidade do oócito é variável; também deve-se considerar as várias diferenças na capacidade dos espermatozóides para fertilizar oócitos *in vitro*, visto que são coletados de diferentes touros, além de alterações nas condições de cultivo pós-fertilização que podem alterar drasticamente a qualidade do embrião. Além disso, após a transferência, a qualidade de embrião PIV é consideravelmente menor que a de embriões produzidos *in vivo*, que tem sido frequentemente associado com anormalidades fetais e neonatais. Geralmente, é aceito que embriões PIV são de qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo* (LONERGAN, 2008).

Apesar dos avanços nos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* a porcentagem de embriões produzidos, capazes de se desenvolver em estágio de blastocisto, ainda é reduzida. Um dos principais fatores que afetam esta taxa é a competência do oócito em realizar a maturação. A fim de melhorar estes resultados tem se pesquisado a interação entre fatores secretados pelos oócitos e a maturação oocitária (THOMPSON et al., 2007; ARRUDA et al., 2010).

Observa-se uma relação entre o tempo para a inovulação e a viabilidade embrionária (LOIOLA et al., 2010). A aquisição da competência oocitária e o desenvolvimento embrionário podem ser interrompidos por alterações no microambiente do trato reprodutivo. Esse fenômeno tem sido notadamente caracterizado em animais expostos ao estresse térmico (LIMA et al., 2010).

A implantação do blastocisto junto ao útero materno é uma adaptação embrionária associada com a viviparidade, requerida para sustentar a nutrição e a proteção do conceito durante a gestação (SPENCER et al., 2004). Nas espécies mamíferas, diferentes estratégias estão envolvidas no processo de implantação. Em roedores, primatas e humanos, os blastocistos são rapidamente implantados no endométrio materno, antes mesmo de se expandirem e formarem as membranas embrionárias (CARSON et al., 2000). Já em ruminantes domésticos, o blastocisto evolui da forma esférica para tubular, alonga-se rapidamente, e as membranas embrionárias são formadas antes da implantação. Nessas espécies, o mecanismo de reconhecimento materno da gestação ocorre no período pré-implantação (SPENCER et al., 2004).

O interferon-tau (IFN- τ) é secretado pelas células mononucleadas do trofoblasto extra-embrionário primitivo, que forma a principal parte da placenta em ruminantes e desempenha um papel essencial no reconhecimento materno da gestação (SPENCER et al., 2004). Vale ressaltar que embriões bovinos começam a expressar IFN- τ com a formação do blastocisto

(FARIN et al., 1990) e portanto, poderia ser aceitável supor que a capacidade de um embrião para produzir grandes quantidades dessa proteína *in vitro* teria correlação com sua habilidade para estabelecer uma gestação. No entanto, existe uma variabilidade considerável entre os embriões com relação à quantidade de IFN- τ por eles produzida que pode estar relacionada com a origem do embrião (KUBISCH et al., 1998), com o tamanho do grupo em que está o cultivo (LARSON e KUBISCH, 1999), ou com o sexo do embrião (LARSON et al., 2001).

As taxas de gestação aos 60 dias, de embriões PIV, têm variado entre 35 a 50%. Dentre os fatores que exercem influência sobre os resultados de prenhez, têm-se: qualidade, avaliação e seleção dos embriões para transferência, estado nutricional e corporal das receptoras, qualidade do corpo lúteo são fatores importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação. Assim como na aspiração folicular, a habilidade do veterinário em realizar a inovulação do embrião de maneira correta, e em menor tempo, tem reflexo direto sobre as taxas de prenhez, além da sincronização do embrião e receptora, considerando que a sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e a data de estro base da receptora também é importante para que o embrião inovulado prossiga seu desenvolvimento (YAMAZAKI, 2007).

Receptoras desempenham um papel importante no sucesso dos programas de transferência de embriões. No entanto, o alto custo de manutenção das receptoras e a baixa eficiência dos protocolos tradicionais baseados em prostaglandina (PGF_{2 α}) para sincronização do estro, limitam uma maior aplicação e o sucesso desta tecnologia (NASSER et al., 2004).

Resultados obtidos por Peixoto et al. (2004) indicaram que melhores taxas de prenhez podem ser obtidas, com a transferência de embriões nos estádios de mórula e blastocisto inicial, aliados à transferência de embriões de qualidade excelente, e considerando as receptoras que manifestaram estro um dia antes ou no mesmo dia da doadora como as mais aptas a receberem os embriões.

Embora a TE seja uma técnica amplamente empregada em todo mundo, essa variabilidade de resposta continua a ser um dos maiores entraves aos programas de sincronização de estro e superovulação em bovinos. Esquemas de sincronização de estro, baseados tanto no controle luteínico quanto no controle folicular do ciclo estral, permitem a inseminação em tempo fixo e eliminam a detecção de estro em receptoras. Estudos realizados, ainda não minimizam adequadamente a variabilidade da resposta à superovulação, mas protocolos de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular oferecem a conveniência de se iniciar os tratamentos mais rapidamente e em momento pré-determinado, sem a necessidade da detecção do estro (BÓ et al., 2004).

Bó et al. (2006) reportaram que apesar da tecnologia de transferência de embriões vir sendo utilizada comercialmente há muitos anos, a ineficiência na detecção de cios, especialmente em gado derivado de *Bos indicus*, tem limitado a sua ampla aplicação, aumentando muito o custo operacional. A incorporação de técnicas desenvolvidas para controlar a dinâmica das ondas foliculares e da ovulação reduz o problema da detecção de cio e propicia a possibilidade de aplicação de programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). As modificações incorporadas mais recentemente, como o tratamento com eCG e as mudanças no momento em que a $PGF_{2\alpha}$ é aplicada, também têm aumentado as taxas de gestação e oferecido idéias interessantes para tornar esses tratamentos são práticos e fáceis de realizar pelos funcionários da fazenda e, mais importante, eles não dependem da habilidade e precisão na detecção do estro.

O conhecimento da fisiologia reprodutiva, principalmente, sobre as diferenças entre taurinos e zebuínos, implica em distintas técnicas de manejo e resposta a tratamentos hormonais. Nesse sentido, em geral, *Bos indicus* apresentam maior número de folículos pequenos nos ovários e ovulam folículos com menor diâmetro, quando comparados a *Bos taurus*; conseqüentemente têm menor corpo lúteo (CL). No entanto, as concentrações circulantes de hormônios esteróides e metabólicas não são necessariamente mais elevadas no gado europeu. Estudos têm evidenciado que, apesar de ovularem folículos menores e formarem menor CL, vacas ou novilhas *Bos indicus* têm maiores concentrações circulantes de estradiol, insulina, progesterona e IGF-I em relação às *Bos taurus*. Além disso, também existem diferenças significativas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* em relação ao tamanho do folículo no momento da seleção do folículo dominante (SARTORI et al., 2010).

O uso de protocolos de sincronização de estro ou de ovulação em receptoras de embriões tem como objetivo a obtenção de animais em fase do ciclo estral compatível com a fase de desenvolvimento embrionário. Entretanto, existem algumas condições imprescindíveis para seu uso, tais como, a detecção do corpo lúteo por palpação retal ou ultrassonografia e observação do comportamento estral nos dias subsequentes ao tratamento (BARREIROS et al., 2006).

O processo de inovulação é semelhante ao adotado para a inseminação artificial (ANDRADE et al., 2002). Sob condições assépticas, a palheta contendo o embrião é encaixada em um aplicador (inovulador) revestido por uma bainha estéril; em seguida é introduzido via transcervical e por manipulação retal é guiada até o corno uterino ipsilateral do corpo lúteo cíclico, onde finalmente o líquido contendo o embrião é depositado (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

3.4 Aspectos Ambientais

O estresse térmico pode comprometer o sistema reprodutivo da fêmea, resultando em uma grande redução do desempenho reprodutivo. Durante a fase de crescimento folicular, o estresse térmico pode acarretar em comprometimento oocitário, tanto pelo efeito direto da elevação de temperatura sobre o gameta, quanto por mudanças nas funções foliculares, que poderiam diminuir a qualidade do oócito. Nesse sentido, oócitos coletados de vacas Holandesas durante o verão possuem menor capacidade de se desenvolverem em blastocistos do que os coletados durante o inverno. Entretanto, apesar de existirem estudos mostrando um efeito evidente do estresse térmico sobre o desenvolvimento oocitário após a fertilização *in vitro* (FIV), os mecanismos exatos pelos quais o oócito é comprometido ainda permanecem desconhecidos (FERREIRA et al., 2010).

Durante o verão, o estresse térmico pode ser considerado um fator importante relacionado à queda de fertilidade e produção, especialmente em animais de origem européia. Os zebuínos são conhecidos pela sua excelente adaptabilidade e rusticidade ao clima tropical. Parte desta adaptação a elevadas temperaturas, está relacionada a capacidade termotolerante de determinadas raças em regular a temperatura corporal. No entanto, o impacto do estresse térmico nas raças zebuínas não deve ser ignorado (TORRES-JUNIOR et al., 2008).

A Região Geomorfológica da Amazônia Legal apresenta um clima Úmido, Megatérmico e Mesotérmico, tendendo para Megatérmico. Sob a influência da baixa latitude, as temperaturas mantêm-se elevadas durante todos os meses do ano e suas médias térmicas anuais são superiores a 22° C nas partes mais elevadas, setores norte e oeste, aumentando de norte para sul até 27° C, quando se aproxima do Equador, com pequena amplitude térmica anual. Devido a fatores geográficos (latitude e relevo) e a fatores dinâmicos, esta região possui altos níveis de eficiência térmica durante todo o ano, razão pela qual é caracterizada por clima Megatérmico. Quanto ao regime pluviométrico, esta região é privilegiada no que diz respeito aos totais anuais, normalmente entre 1.250 mm e 2.500 mm. As chuvas, apesar de regulares, não se distribuem igualmente durante o ano, sendo o período mais chuvoso de maio a agosto, implicando grandes excedentes hídricos e, conseqüentemente, com grandes escoamentos superficiais e cheias dos rios. No período menos chuvoso, resultando numa curta estação seca de um a três meses com pequenos déficits hídricos. Levando-se em conta o regime de umidade, ou seja, os pequenos déficits hídricos e a duração destes períodos secos, foi constatado que neste clima quente e úmido, em quase toda sua extensão. A umidade

relativa do ar, média anual, situa-se entre 60% e 85%, aumentando da zona setentrional para a meridional (AMAZONIA LEGAL, 2010).

O efeito de estresse térmico sobre as concentrações plasmáticas de progesterona é ainda controverso. Pesquisas relataram que as concentrações circulantes de progesterona aumentaram, não alteraram ou diminuíram sob influência do calor (SARTORI et al., 2010). Estes resultados controversos se devem à interferência de muitos fatores não controlados, como: tipo de estresse térmico (agudo ou crônico), ingestão de matéria seca, metabolismo hepático, idade e estágio de lactação (WOLFENSON et al., 2000).

Atualmente é amplamente reconhecido pelos especialistas da área de reprodução animal, que as condições nutricionais exigidas no desenvolvimento folicular e ovulação diferem do sucessivo desenvolvimento embrionário, entretanto estes dois eventos são profundamente interligados (RONDINA, 2010).

4 REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction Fertility**. v. 94, p.177-188, 1992.
- ALVES, B. G.; NEVES, S. M. N.; ARRUDA, R. P.; NAVES, J. H. F. E.; ALVES, K. A.. A classificação do corpo lúteo por assimetria ovariana e sua relação com os índices de prenhe em receptoras de embriões bovinos. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET. Anais..., Gramados, RS. 2008.
- AMAZÔNIA LEGAL. 2010. Disponível em: < [http : // www.noticiasdaamazonia.com.br / amazonia – legal/](http://www.noticiasdaamazonia.com.br/amazonia-legal/). Acesso: 30 de novembro de 2010.
- ANUALPEC: **Anuário estatístico da pecuária de corte**. FNP, 2007.
- ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.
- ANDREOTI, M. **Produção in vitro de embriões bovinos: Uso da glutathione durante o processo de lavagem e capacitação espermática**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil, 2007.
- ARRUDA, N.S.; GALUPPO, A.G.; SILVA, D.S.; CHEUCHE, Z.M.G.; SILVA, C.A.B.; ARRUDA, L.S.; SICCO, O.P.; RUGGERI, R.R.; MARQUES, L.; RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de oócitos como fator promotor da MIV e CIV em bovinos. REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. P.390 (resumos).
- BALL, P.J.H.; PETERES, A.R. **Reprodução em Bovinos: Ciclo ovariano**. 3.ed. São Paulo-SP: 38p., A.R, 2006.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 537-555, 2006.
- BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E. A.; LUDWIG, H. E.; SILVA, D. R. M.; SENEDA, M. M. Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolos de sincronização com clorprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 657-664, 2006.

- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia Reprodutiva de Fêmeas Taurinas e Zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n.2, p. 205-211, 2007.
- BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Brailian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v 27, p. 147-158, 1982.
- BINELLI, M.; IBIAPINA, B.T.; BISINOTTO, R.S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v34, (Supl 1), p.1-7, 2006.
- .BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBUL, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.
- BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, (supl), p.1-22, 2004.
- BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R.; VIANA, J.H.M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. **Acta Scientiae Veterinary**. v.33, p.103-118, (supl.1), 2005.
- BÓ, G.A.; PICINATO, D.; PERES, L.; CUTAIA, L.; NASSER, L.F.; BARUSELLI, P.S. Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, (Supl 1). p.17-23, 2006.
- CAMARGO, L.S.A.; FREITAS, C.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; VIANA, J.H.M. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.1015, 2010.
- CARSON, D.D.; BAGCHI, I.; DEY, S.K.; ENDERS, A.C.; FAZLEABAS, A.T.; LESSEY, B.A.; YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Development Biology**, v.223, p.217-237, 2000.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ J.E.J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian Species. **Reproduction Domestic Animal**. v.36, p.3-9, 2001.

- DODE M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, (Supl 1, p.115-130, 2006.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- FARIN, P.W.; IMIKAWA, K.; HANSEN, T.R.; MCDONNELL, J.J.; MURPHY, C.N.; FARIN, P.W.; ROBERTS, R.M.; Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of reproduction**, v.43, n.2, p.210-218, 1990.
- FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Grau de sincronia doadora-receptora e taxa de gestação. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v.24, (supl), p.207, 1996.
- FERNANDES, C.A.C.; MAESTRI, B.D. Características do embrião e taxa de gestação de receptoras. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v.24, (supl), p.206, 1996.
- FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; OLVEIRA FILHO, B.D.; GAMBARINI, M.L. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **PUBVET**, v.2, n.12, (on line), 2008.
- FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; RODRIGUES, C.A.; FREITAS, B.G.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. Estresse térmico e produção embrionária em vacas de leite de alta produção. REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. P.49-58 (palestras)
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J. M. P Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p. 135-163, 2003.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7^aed. Barueri: Editora Manole, 2004. 513p
- GABALDI, S.H.; WOLF, A.; ESPER, C.R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciência Agrária Saúde**. Andradina, v. 2, n.2, p.61-65, 2002.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2000.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p-599-616, 2003.

- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**. v. 57, p. 1066-1073, 1997.
- GINTHER O.J; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001
- GRADELA, A.; MALHEIROS, R.; URBINATTI, E.C.; BARBOSA, J.C.; ALMEIDA JR, I.L.; ESPER, C.R. Influence of the dominant follicle on the ovarian follicular dynamics in Nelore cows treated with FSH. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v..37, n..4, (online), 2000.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, p.340, 2002.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia da Reprodução. 65p. 2001. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/bioquimica, acesso em: 20/11/2010.
- GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenolog**. v.51, p.951-961, 1999.
- HYTTEL, P. Oocyte growth, capacitation and final maturação in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n.1 p. 23-32, 1997.
- JUNQUEIRA L.C. & CARNEIRO J.C. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v.55, p.333-339,1996.
- KUBISCH, H.M.; LARSON, M.A.; ROBERTS, R.M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.49, n.3, p.254-260, 1998.
- LAROCCA, C.; KMAID, S.; CALVO, J.; ROMANO, J.E.; VIQUEIRA, M. Fertiliaztion in vitro de ovócitos bovinos em Uruguay. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v.24, (supl), p.138-147. 1996.
- LARSON, M.A.; KIMURA, K.; KUBISCH, H.M.; ROBERTS, R.M. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in

the expression of the signaling molecule IFN- τ . **Development Biology**, v.98, p.9677-9682, 2001.

LARSON, M.A.; KUBISCH, H.M. The effects of groups size on development and interferon-tau secretion by in vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. **Human Reproduction**, v.65, p.2075-2079, 1999.

LIMA, R.S.; RISOLLA, P.H.B.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. Indução de apoptose em oócitos bovinos submetidos ao estresse térmico durante os períodos de vesícula germinativa e maturação in vitro. REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. P.380 (resumos).

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**. v.14, n.2, p.458-464, 1999.

LOIOLA, M.V.G.; FERRAZ, P.A.; ODRIGUES, A.S.; ANDRADE, B.H.A.; BITTENCOURT, R.F.; CHAVES NETO, O.D.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M. Influência do momento da inovulação de embriões bovinos produzidos *in vitro* sobre a taxa de gestação. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.380 (resumos).

LONERGAN, P. *In vitro*- produced bovine embryos – dealing with problems. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, (Supl. 2), p.349-360, 2008.

MALARD, P. F., CORDEIRO, D. M., PEIXER, M. A S. Índice de recuperação, qualidade e potencial de desenvolvimento de ovócitos de bezerras zebuínas de 2 a 4 meses de idade; resultados preliminares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 27, p. 256, 1999.

MARQUES, J.A.; PRADO, I.N.; ZAWADZKI, F.; MAGGIONI, D. **Os hormônios da reprodução e o desempenho de fêmeas**. PUBVET, v.2, n.6, 2008.

MARTINS, F. S., SILVA, J. R. V., REDRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF_{2 α} in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.1-5, 2000.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, 1996, p. 1327-1349, 1996.

- NASCIMENTO A.P.; PINHEIRO N.L.; SALES A.; VIANA, J.H. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p. 126-132, 2003.
- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo in *Bos indicus* X *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v.62, p.1577-1584, 2004.
- NILSSON, E.; PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.
- OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSK, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic animal endocrinology**. V.23, p.255-264, 2002.
- PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; ALVIM, M.T.T.; PENNA, V.M. Fatores que influenciaram a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. 2004. SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, V. Pirassununga, SP. (Palestras).
- PUPULIM, A.G.R.; CONSTANT, C.H.O.; AGOSTINHO, B.F.; PUELKER, R.Z.; MAZUCHELI, J.; EMANUELLI, I.P. Meio de transporte embrionário e temperatura de transporte em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), Porto de Galinhas, 2010. p.384 (resumos).
- RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, J.H.M.; HENRY, M. R. J. M. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.3, p.341-347, 2006.
- RAMOS, E. M., CAVALCANTE, T. V., NUNES, R. R. M., OLIVEIRA, C. M., SILVA, S. M. M. S., DIAS, F. E. F., MARUO, V. M., ARRIVABENE, M. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.9, n.4, p. 696-702, 2008.
- RUMPF, R.; BEM, D.E.; PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologias, 2000. P.71-103.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*:

implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v.61, p.234-48, 2002.

RONDINA, D. Interfaces entre nutrição e reprodução dos pequenos ruminantes domésticos e sua importância para o sucesso no uso das biotecnologias da reprodução. 2010. XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), Porto de Galinhas, 2010. p.71-77 (palestra).

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SAKAMOTO, K., MIWA, K., EZASHI, T., OKUDA-ASHITAKA, E., OKUDA, K., HOUTANI, T., SUGIMOTO, T., ITO, S., HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandinF2 α receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 99-105, 1995.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. 2008, SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3. Londrina-PR, 2008.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C. 2010. Bases fisiológicas para entendimento das diferenças do ciclo estral entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.35-41. (palestras)

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SERAPIÃO, R.V.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; GILARDI, S.G.T.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; NOGUEIRA, L.A.G. Criopreservação de embriões bovinos *in vitro*. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.12, n.1/3, p.58-61, 2005.

SERAPIÃO, R. V. **Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* cultivados em meio livre de soro**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

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

SISSON S. & GROSSMAN J.D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981, 1134p.

- SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHART, R.C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v.128, p.657-668, 2004.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.S. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ª edição, 1998.
- SUN, Q.Y. Cellular and Molecular Mechanisms Leading to Cortical Reaction and Polyspermy Block in Mammalian Eggs. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p. 342–348, 2003.
- TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**. v.62, p.206-213, 2000.
- TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**. v.42, p.227-238, 1996.
- THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v.47, p. 131-140, 1997.
- THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- THOMPSON, J.G.; MITCHELL, M.; KIND, K.L. Embryo culture and long-term consequences. **Reproduction fertility and development**, v.19, n.1, p.43-52, 2007.
- TORRES-JUNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.69, p.155-166, 2008.
- VAJTA, G. Cultivo embrionário: preocupações e perspectivas. 2010. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.131. (resumo).
- VALLE, E.R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo Grande: EMBRAPA- -CNPGC, 1991. 24p.
- VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos *cumulus*-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, (Supl 1), p.1-4, 2005.
- VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in

in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p.47–56, 1997.

YAMAZAKI, W. **Aspectos Técnicos e Comerciais da FIV**. 2007. in: <http://www.bioembryo.com.br/index.php/acesso> em 02/03/2010,

WEBB, R.; DUGAN, K.; QUINN, R.L.; FOULADI-NASHTA, A.A.; HUNTER, M.G. Desenvolvimento folicular em espécies mono e poli-ovulatórias: do feto à fertilização. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, (Supl 1), p. 95-114, 2006.

WILLET, E. L. Successful transplantations of fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p.247, 1951.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.535-547, 2000.

Taxa de prenhez em receptoras bovinas inovuladas com embriões produzidos *in vitro* (PIV) na Amazônia Legal

(Pregnancy rates of bovine recipients inovulated with in vitro produced (IVP) embryos in the Legally-defined Brazilian Amazon)

Christiane Medeiros Florentino¹, Juliano Franco de Souza², Fernando Brito Lopes³, Helcileia Dias Santos⁴, Francisca Elda Ferreira Dias⁴, Tânia Vasconcelos Cavalcante⁴, Aurea Wischral⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal

Rural de Pernambuco; ²Laboratório Brio Genética e Biotecnologia Ltda – Araguaína,

Tocantins; ³Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade

Federal de Goiás; ⁴Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do

Tocantins, Campus de Araguaína, BR 153, Km 128 zona rural, Araguaína, TO,

⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco

Correspondência: florentinocm@hotmail.com

RESUMO

O objetivo foi avaliar a eficiência da transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) em diferentes estádios de desenvolvimento através das taxas de prenhez em receptoras inovuladas na região da Amazônia Legal. Avaliou-se 5403 transferências realizadas no período seco e chuvoso, com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento, para receptoras com corpos lúteos de diferentes tipos. Os oócitos foram obtidos de fêmeas zebuínas, por aspiração vaginal guiada por ultrassonografia, e maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Os embriões foram inovulados nos estádios de mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE), em receptoras mestiças cíclicas. Os corpos lúteos das receptoras foram classificados em protusos (CL1: >200mm, CL2: entre 160 a 200mm, CL3: entre 100 a 159mm) e incluso (CL<150mm), através de ultrassonografia. Obteve-se 34,30% (1.855) de receptoras prenhes, com taxa de prenhez significativamente maior nos embriões em estágio de BX (38,2%). Esta taxa de prenhez apenas não diferiu significativamente da obtida em fêmeas inovuladas com embriões em estágio BN (35,9%), no entanto BN não diferiu de MO, BI e BL. As análises demonstraram ausência de correlação entre o tamanho/tipo do corpo lúteo com desenvolvimento de embriões PIV inovulados nos diferentes estádios. Quanto à época do ano em que as inovulações foram realizadas, período chuvoso e seco, as taxas de prenhez não diferiram, 33,7% e 35,7% respectivamente (P>0,05). Os resultados de prenhez obtidos após inovulação com PIV na região da Amazônia Legal

foram semelhantes aos estudos realizados em outras regiões e não foram influenciados pelo período do ano na inovulação. Esses resultados reforçam a necessidade de se continuar a pesquisa em busca da solução dos problemas a cerca do desenvolvimento do oócito para produção de embriões de qualidade, ampliando o conhecimento e dessa forma otimizando a utilização da PIV, o que possibilitará a difusão desta tecnologia visando o aumento da produtividade da pecuária nacional.

Palavras-chave: Blastocisto, Eficiência Reprodutiva, Estação do ano, Transferência de Embriões

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate transfer efficiency of bovine *in vitro* produced (IVP) embryos, at different stages of development through pregnancy rates in inovulated bovine females in the Legally-defined Brazilian Amazon. In order to do so, 5403 embryos were evaluated. Embryos IVP, at different stages of development, were transferred in dry and rainy seasons to animals with different *corpus luteum* types. The oocytes were obtained from zebu females through vaginal aspiration guided by sonogram, matured, fertilized, and cultured *in vitro*. The embryos were inovulated at the stages of morula (MO), early blastocyst (BI), blastocyst (BL), expanded blastocyst (BX), blastocyst hatching (BN) and hatched blastocyst (EB) in cyclic crossbred cows. Corpus lutea were classified by ultrasonography in protruded (CL1:> 200mm, CL2: 160 to 200mm, CL3: 100 to 159mm), and included (CL <150 mm). This resulted in a pregnancy rate of 34.30% (1855), with a significantly higher pregnancy rate for embryos in stage BX (38.2%). This pregnancy rate only did not differ significantly from obtained in females inovulated with embryos stage BN (35.9%), however BN did not differ MO, BI and BL. (P>0.05). The analyses showed no correlation between *corpus luteum* size or type and embryo IVP development, inovulated at different stages. Regarding the season, pregnancy rates were not different for inovulations performed during dry or rainy seasons, with 33.7% and 35.7% respectively (P>0.05). Pregnancy rates obtained after IVP embryo transfer in the Amazon were similar to those seen in studies conducted in other regions, and were not influenced by the season. These results emphasize the need for continuous research in order to solve oocyte development issues, and produce quality embryos, thus augmenting knowledge and optimizing the use of IVP embryos, which will enable the dissemination of this technology aimed to increase livestock production efficiency.

Key words: Blastocyst, Reproductive Efficiency, Season, Embryo Transfer.

INTRODUÇÃO

O componente mais importante na produção animal é a eficiência reprodutiva, fator que, individualmente, mais influencia a lucratividade da exploração pecuária. Assim, o retorno econômico depende de elevadas taxas de prenhez (MACHADO et al., 2009).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), bem como cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. A PIV tornou-se uma valiosa tecnologia de reprodução assistida em sistemas de criação de bovinos e tem sido frequentemente utilizada em animais com baixa fertilidade, mas está se tornando um método de escolha para ampliar o uso de sêmen raro e/ou de alto valor, ou ainda para uso mais eficiente de sêmen em pequenas quantidades, como amostras de sêmen sexado (LONG, 2008).

A PIV de embriões, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas, tem sido fundamental para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período, desde a maturação dos oócitos, incluindo o processo de capacitação espermática e fertilização, até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação (HOSHI, 2003).

A FIV é uma biotécnica usada alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores. A obtenção de oócitos de animais vivos, mediante a técnica de laparoscopia e, mais recentemente, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (Ovum pick-up), tornou possível a aplicação da técnica de PIV visando aumentar o aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores (NAGAI, 2001).

O uso da aspiração *in vivo* de folículos guiada pela ultrassonografia, especialmente em bovinos, evita o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas, mas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou pela transferência de embriões (CONSTANT et al., 2009).

Em vacas cíclicas e sadias, aproximadamente 85% dos oócitos ovulados se desenvolvem até embrião, enquanto que pela recuperação dos oócitos com auxílio de ultrassonografia seguida de produção *in vitro* (PIV), somente 15 a 20% tornam-se embriões transferíveis (RAUBER et al., 2003).

Aproximadamente, 30% dos oócitos que são submetidos ao processo de maturação *in vitro* alcançam o estágio de blastocisto, havendo oscilações desses resultados entre 5 e 60%.

Essas variações tem inúmeras causas, em grande parte devidas à existência de diferenças no potencial dos oócitos em produzir blastocistos, apesar de apresentarem-se morfológicamente normais (GONÇALVES et al., 2002).

Já as taxas de gestação diagnosticadas aos 60 dias, têm variado entre 35 a 50%. Dentre os fatores que exercem influência sobre os resultados de prenhez, têm-se: qualidade, avaliação e seleção dos embriões para transferência, estado nutricional e corporal, qualidade do corpo lúteo, como fatores importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação na receptora. Assim como na aspiração folicular, a habilidade do veterinário em realizar a inovulação do embrião de maneira correta e em menor tempo possível tem reflexo direto sobre as taxas de prenhez, além da sincronização do embrião e receptora uma vez que a sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e data de estro base da receptora também é importante para que o embrião inovulado prossiga seu desenvolvimento (YAMAZAKI, 2007).

Considerável esforço na pesquisa internacional concentra-se na melhoria do potencial de desenvolvimento de embriões PIV, após a transferência, por meio de estudos para melhorar a viabilidade do embrião (OVERSTROM, 1996; THOMPSON et al. 2007). Segundo Yamazaki (2007), dentre os diversos fatores que tem limitado o uso da PIV, destaca-se o fato de o laboratório geralmente ser distante do local onde estão alojadas as receptoras, especialmente nos casos em que a transferência é realizada a fresco. Parece haver uma relação direta entre distância e tempo para a inovulação e a viabilidade dos embriões. Estes problemas poderão ser amenizados à medida que resultados de gestação a partir de embriões PIV congelados forem melhores. Considera-se que a reduzida criotolerância dos embriões tem limitado a congelamento de embriões produzidos *in vitro* em escala comercial.

A Amazônia Legal é um dos biomas mais complexos e ricos do mundo, compreendendo nove Estados Brasileiros (RO, AM, AP, PA, AC, RR, MA, TO, MT). O clima na região é do tipo tropical úmido com temperatura média, máxima de 32°C e mínima de 20°C. Possui uma estação chuvosa definida entre os meses de outubro a maio, e uma estação seca entre os meses de junho a setembro, com precipitação anual acima de 1.700mm (AMAZÔNIA LEGAL, 2010).

A PIV é uma ferramenta útil para multiplicação de animais superiores, apresenta-se como uma alternativa para transferência de embrião convencional, sendo utilizada comercialmente em vários países (CAMARGO et al., 2010).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência da transferência de embriões bovinos, produzidos *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento, através das taxas de prenhez, em receptoras bovinas inovuladas na região da Amazônia Legal.

MATERIAL E MÉTODOS

Todo o experimento foi desenvolvido na região da Amazônia Legal, realizando-se 5403 transferências de embriões (TE) em receptoras bovinas mestiças de cruzamento entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (novilhas e vacas), entre os meses de junho a setembro (período seco) e de outubro a maio (período chuvoso), nos anos de 2007, 2008 e 2009. As TE foram realizadas utilizando embriões produzidos *in vitro* (PIV), em laboratório privado localizado no município de Araguaína-TO. As inovulações foram feitas com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento, classificados de acordo com os critérios da IETS, e somente embriões com grau I e II foram utilizados (WRIGHT, 1998).

Os oócitos foram obtidos de vacas Zebuínas (Nelore, Guzerá, Gir e Tabapuã) submetidas à aspiração folicular transvaginal, guiada por ultrassonografia, independente da fase do ciclo estral e sem tratamento de superovulação.

Após a aspiração folicular, os oócitos foram transportados ao Laboratório de PIV (Brio Embryo Assessoria Agropecuária e Biotecnologia Ltda, Araguaína-TO) e acondicionados em incubadora própria para cultivo celular com temperatura de 38,8°C, umidade relativa do ar de 90% e atmosfera de 5% de CO₂. Neste ambiente os oócitos foram maturados (MIV), fertilizados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV), do momento da aspiração até a realização da inovulação. Para realizar os procedimentos de seleção e classificação dos oócitos foi utilizado um estereomicroscópio com aumento de 10 a 20 vezes o tamanho real dos oócitos. A placa de Petri continha no máximo 3 a 4 mL de líquido folicular uma vez que as quantidades superiores dificultam a visualização e isolamento dos complexos *cumulus oophorus* (CCO's). Os oócitos foram selecionados, classificados sob o estereoscópio e retirados com auxílio de micropipetas contendo diâmetro superior aos dos CCO's evitando assim, a danificação e desnudamento dos mesmos. Os oócitos considerados viáveis foram classificados como graus I, II e III (LOOS et al., 1989) e transferidos para placas de Petri de 35mm contendo meio de transporte, e mantidos até a transferência para a placa de maturação, na incubadora até o momento da FIV. O tempo de maturação dos oócitos neste meio foi de 24 horas, a partir da aspiração. Após 24 horas de incubação no meio de maturação, as placas foram então retiradas da incubadora para realização da FIV. A técnica utilizada para a

separação dos espermatozóides vivos dos demais componentes do sêmen e dos constituintes do meio crioprotetor foi o gradiente de percoll. Para a fertilização *in vitro* os oócitos maturados foram retirados das placas contendo “meio MIV” e transferidos para placas contendo o “meio FIV”, onde foram depositados os espermatozóides. Depois de realizada a fertilização, estas estruturas permaneceram em incubação na placa com “meio FIV” por um período de 18 horas. Decorrido este tempo foi realizado o cultivo *in vivo* (CIV). Durante o processo de produção *in vitro* de embriões (PIV), a clivagem foi avaliada 72 horas após a FIV, onde considerou-se clivados os embriões que apresentavam duas ou mais células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular. O desenvolvimento embrionário *in vitro* foi avaliado no sexto dia de CIV onde se pode visualizar a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocèle.

Após sete dias de cultivo, os embriões em diferentes estádios de desenvolvimento: mórula (MO) (n=156), blastocisto inicial (BI) (n=1030), blastocisto (BL) (n=1682), blastocisto expandido (BX) (n=2421), blastocisto em eclosão (BN) (n=95) e blastocisto eclodido (BE) (n=19), foram transportados devidamente acondicionados a diferentes fazendas da região da Amazônia Legal.

Foram selecionadas receptoras cíclicas, que apresentavam boa condição corporal e *status* sanitário satisfatório, submetidas a exame ginecológico por meio de palpação, antes de ser iniciado o protocolo de sincronização de estro, com o objetivo de verificar a existência de alguma patologia ou má formação dos órgãos do trato reprodutivo.

As receptoras foram submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro em momento desconhecido do ciclo estral (implante auricular, prostaglandina e associação de hormônios) e foram utilizadas apenas aquelas que apresentaram sinais de cio.

Os embriões foram inovulados em 5403 receptoras, e após sete dias de apresentação de estro, pelo método transcervical, no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o corpo lúteo (CL). Previamente à inovulação, um único técnico avaliou as receptoras através da palpação retal e ultrassonografia, com objetivo de verificar a presença de corpos lúteos e a classificação destes quanto à inserção e tamanho. Os corpos lúteos foram classificados em: protusos (CL1: >200mm, CL2: entre 160 a 200mm, CL3: entre 100 a 159mm) e incluso (CL<150mm).

As associações das taxas de prenhez, com os diferentes estádios do desenvolvimento embrionário e período do ano, foram analisadas através do teste estatístico não-paramétrico do Qui-quadrado (χ^2). As estimativas entre os estádios embrionários, tipo de corpo lúteo e a taxa

de prenhez foram determinadas através da correlação de *Spearman*. Todas as análises foram realizadas pelo programa computacional STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS, 2002).

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de prenhez obtidos neste estudo após TE utilizando embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, produzidos por FIV. Das 5403 transferências realizadas, 1855 (34,33%) receptoras apresentaram prenhez, obtendo-se taxa significativamente maior quando utilizou embriões em estádio de BX (38,2%). Esta taxa de prenhez apenas não diferiu significativamente da obtida em fêmeas inovuladas com embriões em estádio BN (35,9%), porém os resultados obtidos com embriões em BN não foram estatisticamente diferentes dos estádios de MO, BI e BL. Das fêmeas inovuladas com embriões em estádio BE, 5/19 ficaram prenhes (26,3%), no entanto esta fase embrionária não foi estatisticamente comparada com as demais devido ao pequeno número de animais inovulados.

Embora as receptoras tenham sido submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro, somente foram inovuladas aquelas que haviam manifestado estro e, no momento da inovulação, apresentavam corpo lúteo de acordo com as medidas realizadas pelo ultrassom.

Tabela 1- Percentagem de receptoras prenhes e vazias, após TE com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, produzidos e inovulados na região da Amazônia Legal

Estádio Embrionário	n total	Fêmeas Prenhes n (%)	Fêmeas Vazias n (%)
MO	156	42(26,9) ^{bc}	114(73,08)
BI	1030	292(28,3) ^c	738(71,7)
BL	1682	558(33,2) ^b	1124(66,8)
BX	2421	924(38,2) ^a	1497(61,8)
BN	95	34(35,9) ^{abc}	61(64,2)

Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto Expandido (BX), Blastocisto em Eclosão (BN).

Letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem estatisticamente ($P>0,05$), teste de Qui-quadrado.

Neste estudo, o diâmetro do corpo lúteo não influenciou a taxa de prenhez de receptoras que foram inovuladas com embriões em diferentes estádios do desenvolvimento. Na tabela 2 são apresentados os resultados da correlação de *Spearman*, onde se observam os baixos coeficientes (r_s), para todas as possibilidades de correlação. De maneira geral, todas as

características apresentaram estimativas de correlações de baixa magnitude, variando de -0,19 a 0,25, sem efeito significativo ($P>0,05$). A única variável que apresentou estimativa de correlação significativa foi à taxa de prenhez em estágio de blastocisto expandido que apresentou-se negativamente associada ao tamanho do corpo lúteo ($r = 19,67\%$) com diâmetro entre 160 a 200mm.

Tabela 2 - Estimativas de correlação de Spearman (r_s e valores de P) entre ovário (direito e esquerdo) e diâmetro de corpo lúteo (CL) das receptoras inovuladas e prenhes com embriões em diferentes estádios de desenvolvimento

Ovário das Fêmeas inovuladas	Diâmetro do Corpo Lúteo (CL) (mm)	Estádio Embrionário					
		MO	BI	BL	BX	BN	BE
Direito	CL1 > 200 (Protuso)	-0.19123 0.0957	-0.21622 0.0589	-0.17852 0.1203	-0.16145 0.1607	-0.01431 0.9017	-0.03059 0.7917
	CL2 160 a 200 (Protuso)	-0.00439 0.9637	0.08623 0.3704	-0.03538 0.7136	-0.19676 0.0394	-0.06423 0.5050	0.05481 0.5696
	CL3 100 a 150 (Protuso)	-0.12835 0.1774	0.01682 0.8602	0.15436 0.1042	-0.01692 0.8595	0.03856 0.6864	0.01874 0.8445
	CL0 < 150 (Incluso)	-0.09782 0.5429	-0.08151 0.6124	0.06920 0.6673	-0.13780 0.3903	0.25700 0.1048	0.06341 0.6937
Esquerdo	CL1 > 200 (Protuso)	0.16678 0.1989	0.14034 0.2807	0.09817 0.4516	-0.08783 0.5009	0.12925 0.3208	0.05795 0.6573
	CL2 160 a 200 (Protuso)	0.03870 0.7173	-0.02867 0.7885	0.07498 0.4824	-0.10857 0.3084	-0.00128 0.9904	-0.04490 0.6743
	CL3 100 a 150 (Protuso)	-0.07704 0.4532	-0.11580 0.2587	0.09249 0.3676	0.05999 0.5594	0.03311 0.7475	-0.09601 0.3496
	CL0 < 150 (Incluso)	-0.12736 0.4729	-0.11680 0.5106	0.03210 0.8570	-0.28453 0.1029	0.15557 0.3796	-0.04916 0.7825

Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto Expandido (BX), Blastocisto em Eclusão (BN), e Blastocisto Eclodido (BE)

No que diz respeito ao período do ano em que as inovulações foram realizadas, os dados apresentados na Tabela 3 demonstraram que as taxas de prenhez não diferiram estatisticamente ($P=0,159$) quando as inovulações foram realizadas no período chuvoso (33,7%) ou seco (35,7%), independente do estágio do desenvolvimento dos embriões.

Tabela 3 - Análise do efeito do período chuvoso e seco sobre o percentual de receptoras prenhes e vazias inovuladas com embriões PIV produzidos na região da Amazônia Legal

Período do Ano	Fêmeas Prenhes (%)	Fêmeas Vazias (%)
Chuvoso	33,7 (n=1264)	66,3 (n=2485)
Seco	35,7 (n=591)	64,3 (n=1063)

No tocante às taxas de prenhez obtidas quando as receptoras foram inovuladas em período chuvoso e seco, considerando os diferentes estádios embrionários, pode-se observar na Tabela 4, que não existiram diferenças significativas ($P > 0,05$) para embriões inovulados nos estádios de MO, BI, BL e BN, com taxa significativamente maior para as fêmeas inovuladas com embriões em estágio de BX, no período seco. Observou-se também, no período chuvoso, taxa de prenhez significativamente maior no estágio de BX em relação a BI ($P = 0,0009$) e BL ($P = 0,04$). No período seco, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os estádios de MO e BX ($P = 0,016$), BI e BL ($P = 0,027$), BI e BX ($P = 0,000$) e BL e BX ($P = 0,004$). A análise estatística não demonstrou diferença entre BN e os demais estádios em nenhum dos períodos estudados, o que pode ser justificado pelo pequeno número de fêmeas inovuladas com BN.

Tabela 4- Percentual de receptoras prenhes (n) inovuladas em período chuvoso e seco com embriões PIV em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário na região da Amazônia Legal

Período do Ano	Estádio Embrionário				
	MO	BI	BL	BX	BN
Chuvoso	27,1(25\92) ^b	29,0(185\638) ^b	32,6(385\1179) ^b	36,4(635\1746) ^b	37,2(29\78) ^b
Seco	26,6(17\64) ^b	27,3(107\392) ^b	34,3(173\503) ^b	42,8(289\675) ^a	29,4 (5\17) ^b

Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto Expandido (BX), Blastocisto em Eclosão (BN)

Letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado.

DISCUSSÃO

Mesmo com as notáveis inovações nos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, duas das maiores frustrações são os baixos índices de prenhez pós-transferência e a maior sensibilidade dos embriões à criopreservação (LONG, 2008). Apesar das inovulações terem sido feitas com embriões frescos, não submetidos à criopreservação, a taxa de prenhez encontrada neste estudo foi de 34,33%.

A taxa de sobrevivência até o nascimento de embriões produzidos *in vivo*, a partir de doadoras superovuladas, é de apenas 43%, com uma variação de 31 a 60%. Com os embriões produzidos *in vitro*, a sobrevivência média é de 30%, com uma variação de 25 a 39% (McMILLAN, 1998), havendo muita variação entre as pesquisas.

A inovulação realizada com embriões em diferentes estádios do desenvolvimento foi avaliada por Fernandes et al. (2004) que obtiveram resultados similares aos encontrados no presente estudo (35,10%) em receptoras inovuladas, apesar de terem empregado em seus estudos embriões congelados, em diferentes estádios de desenvolvimento. Assim esses autores observaram percentuais de prenhez de 44,3%; 31,07%; 40,44% e 24,40% para embriões em estádio de MO, BI, BL e BX, respectivamente, enquanto os dados observados neste estudo apresentaram taxas mais baixas nos estádios de MO (26,9%) a BL (33,2%), porém a maior taxa de prenhez foi observada no estádio de BX (38,2%). Quanto ao maior número de prenhez, obtido quando as receptoras foram inovuladas com embrião no estádio de BX, observou-se concordância com a literatura (HAFEZ e HAFEZ, 2004) que preconiza o estádio de blastocisto como a estrutura ideal para a transferência. Em relação à qualidade dos embriões transferidos, esses estudos estão de acordo com Hasler et al. (1987). O qual cita que quanto melhor a qualidade dos embriões transferidos, maior é o número de fêmeas prenhes, portanto os critérios adotados para a avaliação da qualidade embrionária são necessários.

Também Rodrigues et al. (2004) compararam as taxas de prenhez de embriões frescos e criopreservados em diferentes estádios de desenvolvimento e obtiveram 45,2% e 40,2% (mórula), 48,7% e 31,5% (blastocisto inicial), 48,5% e 36,3% (blastocisto) e 33,3% e 32,7% (blastocistos expandidos) para embriões frescos e criopreservados, respectivamente. No que diz respeito aos embriões inovulados a fresco, os resultados foram similares aos obtidos neste estudo.

Vale ressaltar o dia da realização do diagnóstico de gestação nas receptoras, pois Pontes et al. (2009) demonstraram diferentes taxas de prenhez entre embriões produzidos *in*

vivo e PIV no dia 30 (45,6 e 37,4%) e no dia 60 depois da inovulação (41,5 e 33,5%), respectivamente.

Uma limitação aparente é a falta de um modelo estatístico adequado para a separação das contribuições do embrião e do reconhecimento materno da gestação na sobrevivência embrionária. Como consequência, tem sido difícil determinar se o insucesso da gestação foi decorrente da competência do embrião, receptora, ou dos procedimentos adotados (ZAAIJER et al., 1993).

Algumas receptoras simplesmente não conseguem ficar gestantes por causa da incompetência dos embriões transferidos. Isto é bem ilustrado em estudos nos quais um ou dois embriões foram transferidos para receptoras competentes. Por exemplo, a taxa de prenhez de receptoras de gêmeos é maior em 9% dos casos, quando comparada com a transferência simples ou única (McMILLAN, 1998). Isso sugere que pelo menos 9% de todas as receptoras que recebem a transferência de embriões nesses estudos eram competentes para parir, mas não o fizeram por causa da incompetência embrionária (ZAAIJER et al., 1993).

As receptoras constituem uma parte fundamental de um programa de TE porque necessitam levar a gestação a termo. Fêmeas que apresentam atividade cíclica regular e as primíparas e pluríparas que tenham parido há mais de 60 dias, cujo puerpério tenha decorrido normalmente e que estejam livres de doenças ou anomalias do trato reprodutivo, podem ser selecionadas como receptoras. Porém, o ideal que sejam aproveitadas as fêmeas com histórico reprodutivo conhecido (WILLIAMS, 2001).

Apesar de não ser requerida uma avaliação de qualidade zootécnica da receptora, é fundamental que alguns critérios de seleção sejam adotados, tais como: possuir porte compatível com a raça do embrião a ser transferido garantindo uma gestação e parto normal, livre de auxílio obstétrico, bem como apresentar boa habilidade materna e rusticidade. Entretanto, a seleção final de uma fêmea como receptora somente deve ocorrer no dia da inovulação, baseado nos sinais de estro evidenciados após a sincronização e na avaliação do corpo lúteo funcional (ANDRADE et al., 2002; VALENTIM e GOFERT, 2005; REICHENBACH et al., 2002).

As causas de variação entre as receptoras, dentro de um rebanho, é sua capacidade de iniciar e manter a prenhez são desconhecidas (McMILLAN e DONNISON, 1999).

Vários esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de sincronização do estro utilizando uma combinação de hormônios exógenos, como a gonadotrofina coriônica equina e estradiol (TRIBULO et al., 2002; NASSER et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2004) ou tratamentos adicionais com hormônios específicos, por

exemplo, gonadotrofina coriônica humana (SANTOS-VALADEZ et al., 1982; LOONEY et al., 1984; HASLER et al., 1987; NISHIGAI et al., 2002) e análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (ELLINGTON et al., 1991; SMITH e GRIMMER, 2002), na tentativa de melhorar a sobrevivência do embrião, a função luteal e, conseqüentemente, a taxa de prenhez.

O protocolo padrão para a sincronização das receptoras utiliza normalmente a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (MAHON e RAWLE, 1987; LOONEY et al., 2006; STROUD e HASLER, 2006). Apesar da $PGF_{2\alpha}$ ser um medicamento eficaz e de baixo custo, o sucesso depende da eficiência na detecção de estro, o que pode ser um problema em algumas fazendas (WILTBANK et al., 1995; WEENS et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2009).

Na tentativa de melhorar a sincronização do estro e aumentar o número de receptoras adequadas para receber os embriões produzidos *in vitro*, protocolos baseados no uso de progesterona exógena, gonadotrofina coriônica equina e benzoato de estradiol foram desenvolvidos e têm sido utilizados com sucesso em programas de TE (TRIBULO et al., 2002; NASSER et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2004; THIBIER, 2007).

No entanto, nem o número de estros antes da inovulação, nem o número de tratamentos anteriores para sincronização estral parecem afetar a taxa de prenhez da receptora (HASLER et al., 1987). Além disso, a taxa de gestação não é afetada pelo número de ciclos estrais anormais, incidência de ovários císticos ou a duração comportamental do estro antes da transferência (COLEMAN et al., 1987).

Autores reportaram que alguns tratamentos de sincronização estral podem ter efeitos adversos na gestação (ODDE, 1989; BROADBENT et al., 1991), porém neste estudo, foi considerado que a receptora que apresentou estro e possuía um corpo lúteo no ovário estava apta para ser inovulada. Como é reconhecido por pesquisadores e técnicos que somente se obtém o sucesso na TE quando a receptora é positiva para prenhez (BROADBENT et al., 1991), pois a contribuição relativa do embrião e a competência da receptora fracassam quando não ocorre a gestação.

McMillan e Donnison (1999), demonstraram que repetidas TE com embriões PIV podem gerar grupos de receptoras com diferentes desempenhos na taxa de prenhez. Sugerindo que as diferenças entre esses grupos de receptoras não ocorrem no nível ovariano.

Existem desafios associados à tecnologia PIV, derivados do fato de que a origem dos oócitos utilizados ser desconhecida, principalmente quanto ao estágio do ciclo estral, estágio da onda folicular, etc., e, portanto, a qualidade do oócito se apresentar variável. É aceito que embriões produzidos *in vitro* para fins de transferência são de qualidade inferior àqueles

produzidos *in vivo*, existindo muitos indícios com base em dados morfológicos, de criotolerância e também sobre as taxas de prenhez após a transferência (LONERGAN, 2008).

Os resultados de baixa correlação das taxas de prenhez com as diferentes características e tamanhos dos corpos lúteos observados neste estudo, já haviam sido observadas por Leal et al. (2009) quando avaliaram o corpo lúteo das receptoras, por palpação retal, no dia da transferência de embriões e concluíram que o diâmetro e volume da massa luteal não interferiram nas taxas de prenhez. Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira et al. (2002), que concluíram não haver relação entre o diâmetro do corpo lúteo, avaliado por palpação retal no dia da transferência, e os índices de prenhez em receptoras de embriões. Os autores classificaram o corpo lúteo quanto à inserção e desenvolvimento, utilizando uma escala de 1 a 3, sendo 1 para CL pequeno, 2 para aqueles com diâmetro intermediário e 3 para aqueles que apresentavam diâmetro grande e boa inserção. Entretanto a avaliação do corpo lúteo por palpação retal, apesar de prática e de fácil execução, apresenta limitações devido a sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989).

Leal (2004) reportou que a palpação retal é satisfatória para detectar corpos lúteos médios e grandes, porém é deficiente em avaliar corpos lúteos pequenos. Alguns autores relataram que um método eficaz de se estimar a massa luteal total por palpação retal, é pelo aumento de volume que o corpo lúteo proporciona ao ovário (FERNANDES e VELÁSQUEZ, 1997), porém esta alternativa mostrou-se pouco precisa. Assim, a ultra-sonografia representa uma técnica mais eficiente e precisa para determinar o tamanho e forma de corpo lúteo.

As relações entre tamanho do corpo lúteo, as concentrações de progesterona e as taxas de prenhez em receptoras não são claras e objetivas de vários estudos (HASLER et al., 1980; REMSEN e ROUSSEL., 1982). Há uma discordância sobre se as concentrações circulantes de progesterona elevadas ($> 6,0$ ng / mL) ou baixas ($< 2,0$ ng / mL) afetam as taxas de prenhez (NOGUEIRA et al., 2004; NELSON e NELSON, 1985; NORTHEY et al., 1985).

A receptora de embrião ideal pode ser identificada pela detecção de estro e presença de um CL palpável no momento da inovulação. O tamanho ou a qualidade do CL e as concentrações de progesterona, parecem não ser importantes, pois taxas de prenhez satisfatórias foram relatadas em receptoras com concentrações de progesterona sistêmica muito baixas (< 1 ng/mL) ou muito altas (> 16 ng/mL) (SPELL et al., 2001).

Aparentemente, é difícil determinar se as concentrações circulantes de progesterona são preditores úteis das taxas de prenhez. Talvez a explicação esteja no fato de que ainda não é conhecido o limiar mínimo de concentração sanguínea de progesterona necessária para a manutenção da gestação em bovinos (LUCY, 2001).

Fatores relacionados ao ambiente, como estação do ano, geralmente estão relacionados à disponibilidade de pastagens de melhor qualidade, que poderia influenciar na melhoria da condição corporal das receptoras e na sua habilidade de manutenção de gestação, no entanto, estes fatores parecem não influenciar na taxa de prenhez em TE, como foi aqui observado. Os resultados obtidos neste estudo para as taxas de prenhez referente à estação do ano refletem a homogeneidade das condições climáticas e, conseqüentemente, de nutrição nesta região. No período seco, na Amazônia Legal, as madrugadas apresentam pastagens umedecidas pelas gotas de orvalho, o que provavelmente favorece a planta para que não haja perda de seus nutrientes e o ressecamento da parte folhear, que se apresenta verde durante todo o ano, diferente do que acontece no nordeste brasileiro.

No Brasil, uma das principais razões do baixo desempenho reprodutivo de bovinos são a baixa disponibilidade de alimento e o manejo inadequado nutricional do rebanho. Os requerimentos nutricionais podem afetar as funções reprodutivas se o animal não apresentar um aumento compensatório da ingestão de nutrientes (CARRIJO, 2003).

Na produção animal, particularmente nos bovinos, a utilização da PIV ainda é limitada em função da inconsistência dos resultados referentes às taxas e qualidade de mórulas e blastocistos, do custo inicial para construção da infra-estrutura e do tempo consumido para executar a rotina de produção de embriões, que vai desde a punção folicular *in vivo* até o desenvolvimento *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

Um melhor entendimento de todos os aspectos que afetam a produção *in vitro* de embriões na raça Nelore não deveria apenas beneficiar a indústria de embriões, mas também a aplicação de outras biotecnologias reprodutivas, como transgenia e clonagem conforme proposto por Siqueira et al. (2009).

CONCLUSÕES

Os resultados de prenhez após inovulação com embriões bovinos PIV produzidos na região da Amazônia Legal, apesar de baixos, indicam que a utilização de embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento (blastocisto expandido) tem maior potencial para manter a prenhez do que aqueles mais jovens, independente da qualidade do corpo lúteo da receptora. Como o período do ano em que foram realizadas as inovulações não influenciou as taxas de prenhez, considera-se que não há interferência da temperatura e umidade na manutenção da gestação nesta região.

Estes resultados reforçam a necessidade de se continuar pesquisando em busca da solução dos problemas acerca do desenvolvimento do oócito para produção de embriões de qualidade e ampliar o conhecimento e dessa forma otimizar a utilização da PIV, o que possibilitará o melhor aproveitamento desta tecnologia visando o aumento da produtividade da pecuária nacional.

REFERÊNCIAS

- AMAZÔNIA LEGAL. 2010. Disponível em: < [http : // www.noticiasdaamazonia.com.br / amazonia – legal/](http://www.noticiasdaamazonia.com.br/amazonia-legal/). Acesso: 30 de novembro de 2010.
- ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.
- BROADBENT, P.J.; STEWART, M.; DOLMAN, D.F. Recipient management and embryo transfer. **Theriogenology**, v.35, p.125–139, 1991.
- CAMARGO, L.S.A.; FREITAS, C.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; VIANA, J.H.M. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.1015, 2010.
- CARRIJO, L.H.D. Efeito da nutrição na eficiência reprodutiva de fêmeas de corte. In: Workshop de produção e reprodução de bovinos de corte, I. Goiânia, GO. 2003.
- COLEMAN, D.A.; DAILEY, R.A.; LEFFEL, R.E.; BAKER, R.D. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p.858–866, 1987.
- CONSTANT, C.H.O.; PUPULIM, A.G.R.; AGOSTINHO, B.F.; EMANUELLI, I.P.; RIGOLON, L.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos em cultura individual e em grupos. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar-(EPCC), 6, 2009.
- ELLINGTON, J.E.; FOOTE, R.H.; FARRELL, P.B.; HASLER, J.F.; WEBB, J.; HENDERSON, W.B.; MCGRATH, A.B. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.36, p.1035–1042, 1991.
- FERNANDES, C.A.C.; OLIVEIRA, E.R.; FIGUEIREDO, A. C.S.; GIOSO, M. M. Estágio de desenvolvimento e taxa de gestação de embriões de embriões bovinos congelados em etilenoglicol. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.32 (suplemento), p.159, 2004.
- FERNANDES, C.A.C.; VELÁSQUEZ, L.F.U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Archivos de Reproduction Animal**, v. 1, n. 2, p. 28-31, 1997.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Produção *in vitro* de embriões. In: ____ **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. 560p.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7^a.ed. Barueri - SP: Manole, 2004. 513p.

- HASLER, J.F.; BROWEN, R.A.; NELSON, L.D.; SEIDEL JR., G.E. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. **Journal Reproduction Fertility**, v.58, p71–77, 1980.
- HASLER, J.F.; McCAULEY, A.D.; LATHROP, W.F.; FOOTE, R.H. Effect of donors-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in large scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.27, p.139-168, 1987.
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.
- LEAL, L.S. **Avaliações ovarianas, níveis hormonais e aspectos quantitativos e qualitativos da transferência de embriões em bovinos**. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.
- LEAL, L.S.; OBA, E.; FERNANDES, C.A.C.; SÁ FILHO, O.G. Avaliação do Corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.174-183, 2009.
- LONERGAN, P. Produção in vitro de embriões bovinos – Lidando com os problemas. **Acta Scientae Veterinariae**, v.36 (suplemento 2), p.349-360, 2008.
- LONG, C.R. Eclosão assistida a laser em embriões bovinos produzidos in vitro. **Acta Scientae Veterinariae**, v.36 (suplemento 2), p.311-314, 2008.
- LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H.J.; FORREST, D.W. Improving fertility in beef cows recipients. **Theriogenology**, v.65, 201–209, 2006.
- LOONEY, C.R.; ODEN, A.J.; MASSEY, J.M.; JOHNSON, C.A.; GODKE, R.A. Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. **Theriogenology**, v.21, p.246, 1984.
- LOOS, F.; VAN VILET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**. n.2, p.197-204, 1989..
- LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal Dairy Science**, v.84, p.1277–1293, 2001.
- MACHADO, R.; SUDANO, M.J.; BARBOSA, R.T.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BINELLI, M. Metodologia para obtenção de concepto bovino. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 19, EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, São Carlos-SP, 2009.
- MAHON, G.D.; RAWLE, J.E. The export of deep-frozen bovine embryos. **Theriogenology**, v.27, p.21–35, 1987.

- MCMILLAN, W.H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 50, p.1053–1070, 1998.
- MCMILLAN, W.H.; DONNISON, M.J. Understanding maternal contributions to fertility in recipient cattle: development of herds with in recipient contrasting pregnancy rates. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p.127-140, 1999.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.
- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BO, G.A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v. 62, p.1577–1584, 2004.
- NELSON, L.D.; NELSON, C.F. Effect of estrus detection and corpus luteum development on pregnancy rates in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v.23, p.212, 1985.
- NISHIGAI, M.; KAMOMAE, H.; TANAKA, T.; KANEDA, Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.58, p.1597–1606, 2002.
- NOGUEIRA, M.F.G.; MELO, D.S.; CARVALHO, L.M.; FUCHS, E.J.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG? **Theriogenology**, v.61, p.1283–1290, 2004.
- NORTHEY, D.L.; BARNES, F.L.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.23, p.214, 1985.
- ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal Animal Science**. v.68, p.817-830, 1989.
- OVERSTROM, E.R. In vitro assessment of embryo viability. **Theriogenology**, v.45, p.3-16, 1996.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.
- RAUBER, L.P.; ALVES, D.F.; FIGUEIRÓ, G.M.; BRUM, D.S.; HILGERT, T.F.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Embryo development of bovine oocytes held in follicular fluid from bovine follicles of different diameters. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.169-177, 2003.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, PF.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. 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, p.127-177.

REMSEN, L.G., ROUSSEL, J.D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, v.18, p.365–372, 1982.

RODRIGUES, C.A.; AYRES, H.; REIS, E.L.; NICHI, M.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas Holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.32 (suplemento), p.161, 2004.

SANTOS-VALADEZ, S.; SEIDEL JR, G.E.; ELSDEN, R.P. Effect of hCG on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.17, p.85 (abstract), 1982.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.13 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

SIQUEIRA, L.G.B.; TORRES, C.A.A.; SOUZA, E.D.; MONTEIRO JR, P.L.J.; ARASHIRO, E.K.N.; CAMARGO, L.S.A.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v.72, p.949-958, 2009.

SMITH, A.K.; GRIMMER, S.P. Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. **Theriogenology**, v.57, p.2083–2091, 2002.

SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, p.287–297, 2001.

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**, v. 31, p. 1165-72, 1989.

STROUD, B.; HASLER, J.F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v.65, p65–76, 2006.

THIBIER, M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer - Year 2006. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v25, n.4, 2007

THOMPSON, J.G.; MITCHELL, M.; KIND, K.L. Embryo culture and long-term consequences. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n.1, p.43-52, 2007.

TRIBULO, H.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; GATTI, G.; TRIBULO, R.; CACCIA, M.; BO, G.A. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone, vaginal devices, and eCG, and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v.57, p.57, 2002.

VALENTIM, R.; GOFERT, L. Conceitos sobre sincronização de receptoras, 2005. Disponível em <http://www.beefpoint.com.br>. Acessado em 31/08/2005.

VIEIRA, R.C.; FRANCO, R.V.R.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 99-102, 2002.

WEENS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, v.171, p.206-228, 2006.

WILLIAMS, G. L. Implicações de amamentação e manejo de cria na eficiência reprodutiva futura de vacas de corte. **V Curso Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos**. Uberlândia, 2001. p.65.

WILTBANK, M.C.; SHIAO, T.F.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Prostaglandin F_{2α} receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.52, p.74-78, 1995.

WRIGHT, J. Photomicrographic illustration of embryo codes. In: STRINGFELLOW D.A.; SEIDEL, S.M. (eds.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3rd Ed, Savory, IL: International Embryo Transfer; 1998. p.167-170.

YAMAZAKI, W. Aspectos Técnicos e Comerciais da FIV. 2007. Disponível em <http://www.bioembryo.com.br/index.php>. Acessado em 02/03/2010.

ZAAIJER, D.; COUNOTTE, G.H.M.; SOL, J.; SMIDT, W.J.; BROADBENT, P.J. Changes in the composition of cervical mucous of the cow during the estrous cycle as parameters for predicting potential fertility. **Theriogenology**, v.39, p.569-580, 1993.

Influência do momento da inovulação de embriões Zebuínos produzidos *in vitro* sobre a taxa de prenhez na região da Amazônia Legal

(Time Influence of in vitro produced zebu embryo transfer over pregnancy rate in the Legal Amazon region)

Christiane Medeiros Florentino¹, Juliano Franco de Souza², Fernando Brito Lopes³, Ana Carolina Bernardi Mariani³, Helcileia Dias Santos⁴, Francisca Elda Ferreira Dias⁴, Tânia Vasconcelos Cavalcante⁴, Aurea Wischral⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco; ²Laboratório Brio Genética e Biotecnologia Ltda – Araguaína, Tocantins; ³Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás; ⁴Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína, BR 153, Km 128 zona rural, Araguaína, TO, ⁵Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Correspondência: florentinocm@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se analisar a taxa de prenhez e determinar o tempo ótimo para inovulação de fêmeas bovinas, em função do momento do estro das receptoras, em períodos chuvoso e seco, na região da Amazônia Legal. Foram inovuladas 2.234 receptoras bovinas, provenientes de rebanhos localizados na região da Amazônia Legal. Dentre as receptoras inovuladas, 31 apresentaram estro dois dias antes (D-2) da fertilização *in vitro*, 473, um dia antes (D-1), 1.247, no mesmo dia (D0), 472 um dia após (D+1) e 11 receptoras apresentaram estro dois dias após (D+2) a fertilização *in vitro*. Das receptoras inovuladas, 35,27% apresentaram-se prenhes. Dessas, 57,90% foram inovuladas no D0, enquanto que para os dias D-2, D-1, D+1 e D+2, os percentuais de fêmeas prenhes foram de 0,37%, 22,34%, 19,02% e 0,37%, respectivamente. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) entre as taxas de prenhez obtidas nos grupos de sincronização D-1, D-0 e D+1, considerando os dias de detecção do estro e o dia em que as receptoras foram inovuladas, com relação à taxa de prenhez. Em relação à estação do ano em que foram realizadas as inovulações (seca e chuvosa), as fêmeas com sincronização de D-1, D-0 e D+1 não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) quanto a taxa de prenhez, seja dentro de cada período de sincronização ou na taxa de prenhez total da estação. Concluindo-se que a sincronia de até ± 1 dia é melhor

para o estabelecimento da prenhez obtida a partir de embriões PIV e que na Amazônia Legal a estação do ano não é fator limitante para a manutenção da gestação destes embriões.

Palavras-chave: Estro, fertilização *in vitro*, zebuínos

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the pregnancy rate, and determine optimal ovulation timing of bovine females, as a function of oestrus, during the dry and rainy seasons. To do so, 2234 animals in the Legally-defined Brazilian Amazon region were ovulated. Estrus manifestation was observed two days before (D-2) in 31 of the recipients, one day before (D-1) in 473, on the exact day (D-0) in 1247, and one day after (D+1) *in vitro* fertilization, in 472, respectively. 11 of the animals revealed estrus behavior two days (D+2) after *in vitro* fertilization. 35.27% of all ovulated animals conceived. Pregnancy rates were: 57,90% for D0, while D-2, D-1, D-0, D+1 and D+2 were 0.37%, 22.34%, 57.90%, 19.02 and 0.37%, respectively. Considering pregnancy rates and oestrus detection, there was no observable difference ($P>0.05$) between D-1, D-0 and D+1. With regard to weather conditions, cows fertilized in D-1, D-0 and D+1, showed no significant difference in pregnancy rates, in both seasons ($P>0.05$). Therefore, it can be concluded that a synchronism of ± 1 day interval from estrus manifestation is optimal for the achievement of pregnancy through *in vitro* fertilization, either in dry or rainy seasons.

Key-words: Estrus, *in vitro* fertilization, zebus

INTRODUÇÃO

A expressão produção *in vitro* (PIV) de embriões é utilizada para designar um conjunto de procedimentos realizados em laboratório, incluindo etapas de maturação, fertilização e cultivo, pelos quais oócitos imaturos são empregados para a produção de embriões. Até o final da década de 90, a PIV no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem expressão comercial. No entanto, essa técnica vem tornando-se uma prática promissora, e, certamente, terá importante papel na aplicação comercial de programas de melhoramento genético (SERAPIÃO et al., 2005). É uma ferramenta útil para multiplicação de animais superiores e apresenta-se como uma alternativa para transferência de embrião convencional, sendo utilizada comercialmente em vários países (CAMARGO et al., 2010).

O sucesso comercial da PIV no Brasil está relacionado a um complexo conjunto de fatores biológicos e de mercado, incluindo as características da fisiologia reprodutiva das fêmeas zebuínas (VIANA et al., 2010). Galli et al. (2003) reportaram o importante papel desempenhado pelo touro na PIV, apenas uma pequena proporção de touros tem menor desempenho que outros (<5%) para realizar a fertilização. Um outro fator relatado pelos mesmos autores que afeta o sucesso da PIV é o complexo do *cumulus oophorum*. Sendo importante padronizar os procedimentos de preparação do oócito antes da PIV, a fim de obter uma população homogênea de oócitos com *cumulus* que deve estar positivamente relacionada com a concentração necessária de espermatozóides. Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas, ao longo dos anos, permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. O número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões (GONÇALVES et al., 2007)

Por meio dessa biotécnica, é possível obter rápida multiplicação de genótipos superiores previamente selecionados e uma diminuição no intervalo de gerações, propiciando uma maior intensidade de seleção, em relação a outros processos, como a transferência de embriões. Além disso, possibilita o aumento do progresso genético de rebanhos e ganhos monetários com a venda de animais geneticamente superiores. No entanto, diversos fatores influenciam os resultados da PIV de embriões bovinos. O momento da inovulação, muitas vezes pode variar, principalmente devido à distância entre o laboratório e o local onde são criadas as receptoras (LOIOLA et al., 2010), podendo ocorrer diferença entre o dia em que aconteceu a fertilização no laboratório e a manifestação do estro das receptoras, com a assincronia entre idade do embrião e o estado de influência hormonal no útero da receptora.

A seleção adequada e o manejo das receptoras são fatores importantes e que afetam os resultados na implantação de um programa de transferência de embrião. Os critérios de seleção incluem sanidade, condição corporal, idade, categoria e boa habilidade materna. As receptoras necessitam ciclar normalmente e não apresentarem problemas reprodutivos, devendo ser realizado exame ginecológico completo. A utilização de tratamento hormonal e/ou suplementação nas receptoras é tópico de diversas pesquisas (BARUSELLI et al. 2010). Receptoras desempenham um papel importante no sucesso dos programas de transferência de embriões. No entanto, o alto custo de manutenção dessas e a baixa eficiência dos protocolos tradicionais baseados em prostaglandina (PGF_{2α}) para sincronização do estro das fêmeas, limitam uma maior aplicação e o sucesso dessa tecnologia (NASSER et al. 2004).

Neste estudo, objetivou-se analisar a taxa de prenhez e determinar o tempo ótimo para inovulação de fêmeas bovinas, em função do momento do estro das receptoras, em períodos chuvoso e seco, na região da Amazônia Legal.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da PIV, os oócitos foram obtidos de vacas Zebuínas (Nelore, Guzerá, Gir e Tabapuã) submetidas à aspiração folicular transvaginal, guiada por ultrassonografia, independente da fase do ciclo estral e sem tratamento de superovulação.

Após a aspiração folicular, os oócitos foram transportados ao laboratório de PIV e acondicionados em incubadora própria para cultivo celular com temperatura de 38,8°C, umidade relativa do ar de 90% e atmosfera de 5% de CO₂. Nesse ambiente controlado os oócitos foram maturados (MIV), fertilizados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV), do momento da aspiração até a realização da inovulação.

Para realizar os procedimentos de seleção e classificação dos oócitos foi utilizado um estereoscópio com aumento de 10 a 20 vezes o tamanho real dos oócitos. Em cada placa de Petri foram colocados, no máximo, 3 a 4 mL de líquido folicular, uma vez que quantidades superiores dificultam a visualização e isolamento dos complexos *cumulus oophorus* (CCO's).

Os oócitos foram selecionados, classificados sob o estereomicroscópio e retirados com auxílio de micropipetas com diâmetro superior aos dos CCO's evitando assim, a danificação e desnudamento dos mesmos. Os oócitos considerados viáveis foram classificados em graus I, II e III (LOOS et al., 1989) e transferidos para placas de Petri de 35mm contendo meio transporte, e mantidos até a transferência para placa de maturação, quando foram colocados na incubadora até o momento da FIV, com tempo de maturação dos oócitos nesse meio foi de 24 horas, a partir da aspiração. Após 24 horas de incubação, no meio de maturação, as placas foram então retiradas da incubadora para realização da FIV. A técnica utilizada para a separação dos espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos constituintes do meio crioprotetor foi o gradiente de Percoll. Para a fertilização *in vitro*, os oócitos já maturados foram retirados das placas contendo “meio MIV” e transferidos para placas contendo o “meio FIV”, onde foram depositados os espermatozoides.

Depois de realizada a fertilização, estas estruturas permaneceram em incubação na placa com “meio FIV” por um período de 18 horas. Decorrido este tempo foi realizado o cultivo *in vivo* (CIV). Durante o processo de PIV de embriões, a clivagem foi avaliada 72 horas após a FIV e considerados clivados os embriões que apresentaram duas ou mais

células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular. O desenvolvimento embrionário *in vitro* foi avaliado no sexto dia de CIV, pela visualização da compactação dos blastômeros e do início da formação da blastocèle.

Após sete dias de cultivo, os embriões, em estádios de mórula e blastocistos, foram transportados, devidamente acondicionados, para diferentes fazendas na região da Amazônia Legal, onde as receptoras haviam sido preparadas.

Foram selecionadas receptoras cíclicas, vacas e novilhas, mestiças, com idades entre 18 a 36 meses, que apresentavam boa condição corporal (ECC 2 e 3, escala de 0-5) e *status* sanitário satisfatório. Antes de ser iniciado o protocolo de sincronização de estro, todas foram submetidas a exame ginecológico, com o objetivo de verificar a existência de alguma patologia ou má formação da genitália. Todas as fêmeas foram alimentadas predominantemente em pastagens de *Brachiaria brizantha* e recebiam suplementação mineral e água à vontade.

As receptoras foram submetidas a diferentes protocolos de sincronização de estro em momento desconhecido do ciclo estral (implante auricular, prostaglandina e associação de hormônios) e utilizadas apenas as que apresentaram sinais de estro. A sincronização do estro da receptora foi relacionada ao dia da FIV.

Foram utilizadas 2234 receptoras bovinas que manifestaram estro e foram inovuladas com embriões produzidos *in vitro* a partir de doadoras de oócitos da raça Nelore, Guzerá, Gir e Tabapuã, provenientes de rebanhos localizados na região da Amazônia Legal (Longitude Oeste 61°30'/62°00'; Latitude Sul 9°20'/10°15'), entre os meses de junho a setembro (período seco) e de outubro a maio (período chuvoso).

As inovulações foram realizadas nas receptoras que se encontravam após 5 (D-2), 6 (D-1), 7 (D0), 8 (D+1) e 9 (D+2) dias da detecção do estro. Os embriões tinham sete dias de maturação (MIV) e apresentavam graus de qualidade I, II ou III (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998)

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia retal, 30 dias após a inovulação.

Os índices de prenhez foram analisados através do teste estatístico não-paramétrico do qui-quadrado (χ^2). Também foi realizada análise de regressão entre a taxa de prenhez e o dia da fertilização *in vitro*, em relação ao dia do estro. Todas as análises foram realizadas fazendo-se uso do programa computacional STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS, 2002).

RESULTADOS

Do total de 758 (35,27%) fêmeas prenhes, 57,97% foram inovuladas no sétimo dia após estro (D0), 22,33% no dia D-1, 19,04% no dia D+1 e 0,38% nos dias D-2 e D+2.

Pode-se observar na Tabela 1 o percentual de receptoras de embriões produzidos *in vitro* (FIV), prenhes e vazias, em função do dia de detecção do estro. Os resultados indicam que as melhores taxas de prenhez foram obtidas em fêmeas inovuladas nos dias 6 (37,2%), 7 (36,5%) e 8 (31,8%) após o estro, não havendo diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre as taxas de prenhez obtidas nesses períodos. Taxa de prenhez significativamente menor foi obtida em fêmeas inovuladas no dia -2 (5 dias após o cio) e no dia +2 (9 dias após o cio), não havendo diferença significativa entre os dois períodos, apesar de maior taxa ser observada no dia +2, mas a falta de significância também pode ter ocorrido devido ao baixo número de animais inovulados nestes períodos.

Tabela 1 – Percentual e quantidade (n) de receptoras bovinas mestiças prenhes e vazias inovuladas com embriões de sete dias produzidos *in vitro* (PIV), em função do dia da manifestação do estro

Estro	Total (n)	Fêmeas prenhes n(%)	Fêmeas vazias n (%)
-2 (5º dia)	31	3 (9,7) ^a	28 (90,3)
-1 (6º dia)	473	176 (37,2) ^b	297 (62,8)
0 (7º dia)	1247	456 (36,5) ^b	791 (63,5)
+1 (8º dia)	472	150 (31,8) ^{bc}	322 (68,2)
+2 (9º dia)	11	3 (27,3) ^{ac}	8 (72,7)
TOTAL	2234	788 (35,27)	1446 (64,73)

^a Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ($P>0,05$) entre si pelo teste de Qui-quadrado.

No Gráfico 1 pode-se observar a análise de regressão entre a taxa de prenhez e o dia no qual as receptoras foram inovuladas, considerando-se 0 como o sétimo dia do estro. A curva de regressão demonstrou que, utilizando-se embriões de sete dias, as melhores taxas de prenhez foram obtidas quando as fêmeas foram inovuladas entre o sexto e oitavo dia após o estro.

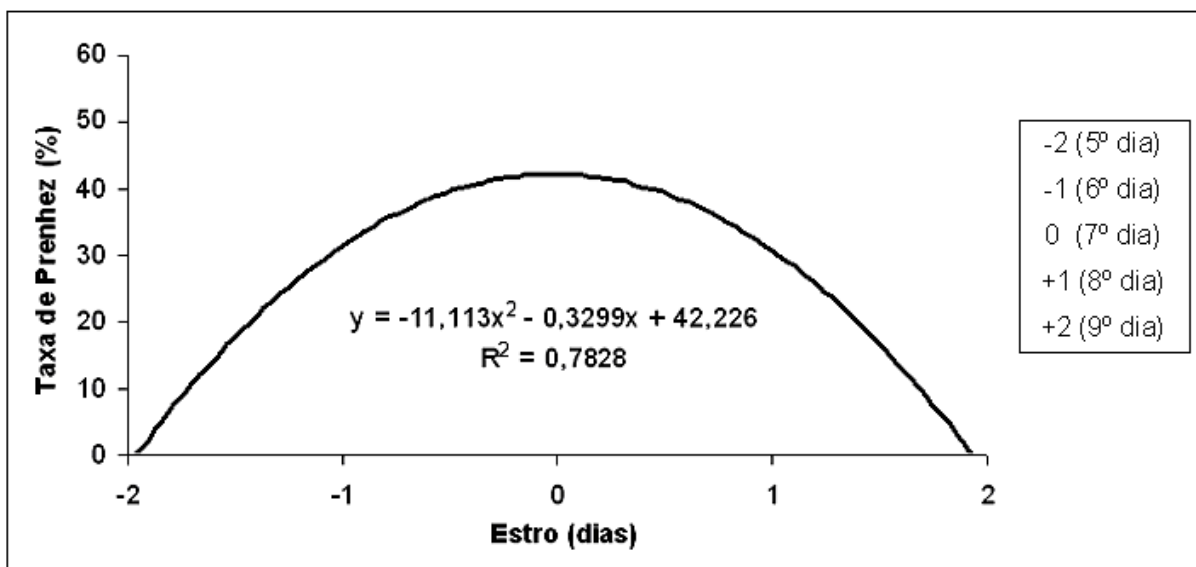


Gráfico 1 – Análise de regressão entre a taxa de prenhez e o dia da inováção (dias da FIV) de receptoras em relação ao dia da detecção do estro.

Considerando-se a estação do ano em que foram realizadas as inováções (seca e chuvosa), foram analisadas apenas as fêmeas com sincronização de até ± 1 dia, que não apresentaram diferenças significativas entre si quanto a taxa de prenhez. Nessa comparação, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) foi observada dentro de cada período ou na taxa de prenhez total (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade (prenhes/total) e percentual (%) de fêmeas prenhes relacionadas ao dia da FIV e após a detecção do Estro em função da estação do ano (chuvosa e seca)

Estação	FIV – Dia após do Estro*			
	D-1	D0	D+1	TOTAL
Chuvosa	81/244 (33,20) ^a	231/652(35,43) ^a	67/212 (31,60) ^a	379/1108 (34,20) ^a
Seca	95/229 (41,48) ^a	225/595(37,81) ^a	83/260 (31,92) ^a	403/1084(37,17) ^a

^a Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) entre si pelo teste de Qui-quadrado.

* Dia do Cio: (-1) um dia antes da fertilização; (0) no dia da fertilização; (+1) um dia depois da fertilização

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstraram que os embriões inovulados em receptoras com sincronia fisiológica entre o dia da FIV e a manifestação do estro, com diferença de até ± 1 dia, não apresentaram diferença significativa, com taxa de prenhez variando entre 31,8 e 37,2%. Estas taxas de prenhez corroboram as de outros autores, a exemplo de McMillan (1998), que produziu embriões *in vitro*, e obteve taxa de gestação média de 30%, com uma variação de 25 a 39% e Fernandes et al. (2004) que obtiveram resultados similares de prenhez (35,10%), em receptoras inovuladas com embriões congelados em diferentes estádios de desenvolvimento.

Taxas de gestação mais altas foram relatadas por Numabe et al. (2000) após transferência dupla (52, 1%) e simples (42,9%) de embriões frescos produzidos *in vitro* e inovulados em receptoras Holandesa no dia 7 ± 1 do ciclo estral.

Nasser et al. (2004) obtiveram taxas de prenhez que variaram de 36,1 a 63,4 %, quando transferiram embriões PIV no 7º dia após o cio, sincronizado com dispositivos intra-vaginais a base de progesterona por 8 dias e diferentes protocolos hormonais adicionais. Observaram que o melhor resultado foi obtido quando foi aplicada gonadotrofina coriônica equina (eCG) no 5º dia do tratamento progesterônico, o que também foi associado a uma maior concentração de progesterona sanguínea.

Berg et al. (2010) estudaram a mortalidade de embriões produzidos *in vitro* transferidos, aos 7 dias, para vacas não lactantes e novilhas *Bos taurus*. O estudo foi realizado entre os dias 7 e 16 após a transferência e demonstrou haver menor perda embrionária em novilhas do que em vacas paridas, evidenciando o efeito do útero sobre a sobrevivência embrionária, uma vez que os embriões transferidos para novilhas cresceram duas vezes mais do que o das vacas, neste período. Os autores observaram também que não houve efeito do ano, da estação do ano, nem da quantidade de embriões transferidos na taxa de prenhez. Todas as fêmeas foram sincronizadas de forma semelhante e inovuladas com sete dias após a apresentação do estro, tornando improvável que as falhas na manutenção da gestação sejam devidas à assincronia entre embrião e receptora. Indicando que a razão pela qual a receptora não conseguiu manter a gestação estava presente antes do momento da transferência e provavelmente sejam mais devidas à condição do embrião do que ao ambiente uterino.

Há muito tempo, é conhecido que o grau de sincronização entre o embrião e o estro da receptora influencia a taxa de prenhez. Vários estudos parecem indicar que a sincronia é mais crítica em receptoras de corte que de leite. Entretanto, nos estudos de Hasler (2001) quando

receptoras de corte e leiteiras foram comparadas não houve diferença nas exigências de sincronia para cada raça. Também, uma assincronia de 24 horas, para mais ou para menos, entre doadora e receptora, não compromete a taxa de prenhez quando são transferidos embriões frescos ou congelados (ALVAREZ, 2010). Ainda nesse sentido, o ambiente uterino, assim como o metabolismo do embrião variam durante os estádios iniciais de desenvolvimento, havendo uma sintonia entre as condições uterinas, controlada principalmente pelos níveis de esteróides circulantes e o metabolismo do embrião (FERNANDES e VIANA, 1996).

Estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar diversos fatores (composição do meio, hormônios, a atmosfera de gás e qualidade de sincronização de receptoras) que influenciam o desenvolvimento embrionário, durante e após o cultivo *in vitro* (MAO et al., 2002). No entanto, pouca informação está disponível na literatura, quanto à sincronia entre os embriões PIV e a receptora. Os resultados deste estudo, no tocante à importância da sincronia do útero receptor e o desenvolvimento do embrião resultante de FIV, demonstram indícios que tanto embriões *in vivo* quanto *in vitro* requerem as mesmas condições. Neste sentido, Fernandes e Viana (1996) reportaram que receptoras de embriões que manifestarem estro num período superior a 36 horas, antes ou após a doadora, exibem uma taxa de gestação inferior àquelas mais sincronizadas.

Lonergan (2008) relatou que existem diferenças em nível morfológico, ultraestrutural, fisiológico, transcricional e metabólico entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* e isso pode sugerir que deveria haver uma ampla variedade de ferramentas disponíveis para identificar aqueles embriões PIV com características mais próximas dos embriões *in vivo*. O mesmo autor afirmou que o embrião bovino PIV é, sem dúvida, muito diferente, em muitos aspectos, de seu homólogo produzido *in vivo* e claramente existem alguns problemas associados com embriões produzidos dessa forma. Entre esses aspectos, Mao et al. (2002) enfatizaram que o dia em que a receptora entra no estro deve ser um dos responsáveis pela menor taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

Loiola et al. (2010) avaliaram a influência do momento da inovulação de embriões bovinos da raça Nelore, produzidos *in vitro*, sobre a taxa de gestação de receptoras. Sete dias após a fertilização, os embriões produzidos foram enviados em criotubos com meio de cultivo específico a 37 ° C, umidade saturada e atmosfera com 5% de CO₂, para o Estado do Bahia onde se realizaram as inovulações. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o momento das inovulações, manhã, tarde e noite. O diagnóstico foi realizado por exame ultra-sonográfico 30 dias após a fertilização e as taxas de

preñez para embriões inovulados pela manhã (35,9%) e tarde (40,8%) não diferiram, bem como entre a tarde (40,8%) e noite (50,0%), no entanto houve diferença entre as taxas de gestação no turno da manhã e da noite. Segundo os autores, a explicação para estes achados seria o maior tempo de permanência dos embriões no meio de cultivo, o que poderia ter aumentado a viabilidade embrionária. Apesar de os objetivos terem sido diferentes, as taxas de gestação do grupo inovulado pela manhã.

Spell et al. (2001) mostraram categoricamente que o tamanho do corpo lúteo, critério ainda utilizado por alguns técnicos para selecionar receptoras não influencia a taxa de preñez.

Pesquisas realizadas por Caldas et al. (1996), avaliando a concentração de progesterona plasmática em receptoras da espécie bovina, no dia da inovulação, verificaram que 100% das receptoras que apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona maiores que 4ng/mL tornaram-se gestantes. No entanto, aparentemente, ainda é difícil determinar se as concentrações circulantes de progesterona são preditores úteis das taxas de preñez, pois ainda não é conhecido o limiar mínimo de concentração sanguínea de progesterona necessária para a manutenção da gestação em bovinos (LUCY, 2001).

Sartori et al. (2010) relataram a escassez de trabalhos que, efetivamente, comparem a fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. Citando que apesar de haver relatos de diferenças entre as diversas variáveis do ciclo estral entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, a grande maioria dos trabalhos não foi desenvolvida nas condições de clima tropical, encontrado no Brasil.

Apesar de não ser requerida uma avaliação de qualidade zootécnica da receptora, é fundamental que alguns critérios de seleção sejam adotados, tais como: possuir porte compatível com a raça do embrião a ser transferido, garantindo uma gestação e parto normal, bem como apresentar boa habilidade materna e rusticidade. Entretanto, a seleção final de uma fêmea como receptora somente deve ocorrer no dia da inovulação, baseado nos sinais de estro evidenciados após a sincronização e na avaliação do corpo lúteo funcional (ANDRADE et al., 2002; REICHENBACH et al., 2002).

Segundo Pimentel et al. (2005), o escore de condição corporal tem sido utilizado para avaliar a condição nutricional dos bovinos, conseqüentemente o desempenho reprodutivo. A condição corporal influencia, principalmente, a capacidade de conceber na estação reprodutiva (SONOHATA et al., 2009).

Os resultados obtidos neste estudo, apresentados na Tabela 2, para as taxas de preñez nas estações do ano, seca e chuvosa, refletem a homogeneidade das condições climáticas e,

consequentemente, de nutrição nesta região, não apresentando interferência desta variável sobre a taxa de concepção. Resultados diferentes foram relatados por Nasser et al. (2009), em um estudo retrospectivo, na Argentina, onde reportaram que a estação do ano afeta a taxa de concepção após a transferência de embriões frescos, produzidos *in vitro*, em receptoras de corte *Bos taurus x Bos indicus*. Houve redução na taxa de gestação observada durante o outono e inverno (41.1% - 448/1090), comparado com primavera e verão (48.1% - 1760/3658).

Al-katanani et al. (2002) avaliaram a taxa de gestação em vacas leiteiras, em lactação, sob condições de estresse térmico, que haviam recebido embriões produzidos *in vitro* frescos ou vitrificados, comparados a resultados de inseminação artificial em tempo fixo. Observaram que embriões PIV transferidos frescos, no dia 7, resultaram em maior taxa de prenhez do que os vitrificados e também das vacas inseminadas. Com isso consideraram que a transferência de embriões evitou os possíveis efeitos deletérios do estresse térmico sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Na Amazônia Legal, durante o período seco, as madrugadas apresentam pastagens umedecidas pelas gotas de orvalho, provavelmente favorecendo a planta, evitando que haja perda de seus nutrientes e o ressecamento da parte folhear. Apresentando-se verde durante todo ano, diferente do que acontece nas regiões semiáridas. Sendo assim, este deve ser o motivo pelo qual a estação climática não interferiu na taxa de prenhez das receptoras deste estudo.

Fatores relacionados ao ambiente, como estação do ano, geralmente estão relacionados à disponibilidade de pastagens de melhor qualidade em uma época do ano, que poderia influenciar na melhoria da condição corporal das receptoras e na sua habilidade de manutenção de gestação, no entanto, estes fatores parecem não influenciar na taxa de prenhez em TE, como foi aqui observado. Vale ressaltar que Bastos et al. (2010) demonstraram que mesmo em condições climáticas e nutricionais similares há grandes diferenças na função ovariana e nos hormônios circulantes entre taurinos e zebuínos. Apesar de as estruturas ovarianas, como o corpo lúteo das fêmeas zebuínas serem menores que nas *Bos taurus*, as fêmeas *Bos indicus* apresentam maior concentração circulante de hormônios esteróides e metabólicos do que as taurinas (SARTORI et al., 2010). Também é importante lembrar que a progesterona (P4) é um dos principais hormônios envolvidos no controle da reprodução, e essencial para a manutenção da prenhez (CALDAS et al. 1996).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que a inovulação a fresco de embriões PIV pode ser realizada para receptoras com diferença de ± 24 horas de sincronização entre o momento da FIV e a detecção do estro, sem prejuízo para a taxa de prenhez. Nas condições climáticas da Amazônia Legal, o período do ano não é fator limitante para o sucesso da transferência de embriões PIV.

REFERÊNCIAS

- AL-KATANANI, Y.M.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; KRININGER III, C.E.; BLOCK, J.; THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Pregnancy rates following timed embryo transfer with or vitrified in vitro dairy cows under heat stress conditions. **Theriogenology**, v.58, p.171-182. 2002.
- ALVAREZ, R. H. Uma abordagem sucinta do “estado de arte” da transferência de embriões bovinos e tecnologias correlatas (disponível: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1201880843.pdf>). Acesso em setembro de 2010.
- ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; NASSER, L.F.T.; RODRIGUES, C.A.; BO, G.A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.67-74, 2010.
- BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P.; SURJUS, R.S.; GUARDIEIRO, M.M.; FERREIRA, J.C.P.; MOURÃO, G.B.; PIRES, A.V.; BIEHI, M.V.; PEDROSO, A.M.; SANTOS, F.A.P.; SARTORI, R. Função ovariana e hormônios circulantes em vacas não lactantes das raças Nelore e Holandês. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.390 (resumos).
- BERG, D.K.; LEUEUWEN, J.V.; BEAUMONT, M.B.; PFEFFER. Embryo loss in cattle between days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v.73, p.250-260, 2010.
- CALDAS, M.C.S.; NOGUEIRA, M.F.G.; PUPIM, F.P.V.; ROSA E SILVA, A.A.M. Concentração de progesterona plasmática em receptoras no dia da inovulação de embriões bovinos descongelados, um indicativo de futura prenhez. **Arquivo Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.24, (Supl.), p.200, 1996.
- CAMARGO, L.S.A.; FREITAS, C.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; VIANA, J.H.M. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.1015, 2010.
- FERNANDES, C.A.C.; OLIVEIRA, E.R.; FIGUEIREDO, A. C.S.; GIOSO, M. M. Estágio de desenvolvimento e taxa de gestação de embriões bovinos congelados em etilenoglicol. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.32 (suplemento), p.159, 2004.

- FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Grau de sincronia doadora-receptora e taxa de gestação. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.24, (supl), p.207, 1996.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p-599-616, 2003.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.
- HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1401-1415, 2001.
- LOIOLA, M.V.G.; FERRAZ, P.A.; ODRIGUES, A.S.; ANDRADE, B.H.A.; BITTENCOURT, R.F.; CHAVES NETO, O.D.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M. Influência do momento da inovulação de embriões bovinos produzidos *in vitro* sobre a taxa de gestação. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.380 (resumos).
- LONERGAN, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos – Lidando com problemas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, (suplemento n.2), p.349-360, 2008.
- LOOS, F.; VAN VILET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**. n.2, p.197-204, 1989.
- LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal Dairy Science**, v.84, p.1277–1293, 2001.
- MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; MCCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, n.67, p.1197-1203, 2002.
- McMILLAN, W.H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 50, p.1053–1070, 1998.
- NASSER, L.F.; SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.F. Factors influencing the *in vitro* embryo survival after fixed-time embryo transfer. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF ANIMAL REPRODUCTION, Argentina, 2009. (palestras).

- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BO, G.A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo in *Bos indicus* X *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v.62, p.1577-1584, 2004.
- NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Production efficiency of Japanese Black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v.54, p.1409-1420, 2000.
- PIMENTEL, M.A.; MORAES, J.C.F.; JAUME, C.M.; LEMES, J.S.; BAUNER, C.C. Produção de leite e desempenho pós-parto de vacas Hereford em distintas condições reprodutivas criadas extensivamente. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.150-156, 2005.
- REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, MAL.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. 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, p.127-177.
- SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C. Bases fisiológicas para entendimento das diferenças do ciclo estral entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXIV, Porto de Galinhas, PE. 2010. p.35-41. (palestras)
- SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.13 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.
- SERAPIÃO, R. V.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; GILARDI, S.G.T.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; NOGUEIRA, L.A.G. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.12, n.1/3, p.58-61, 2005.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (eds). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. International Embryo Transfer Society. p. 103–134. 1998.
- SONOHATA, M.M.; OLIVEIRA, C.A.L.; CANUTO, N.G.D.; ABREU, U.G.P.; FERNANDES, D.D. Escore de condição corporal e desempenho reprodutivo de vacas no Pantanal do Mato Grosso do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.10, n.4, p.988-998, 2009.
- SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, p.287–297, 2001.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA

DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), Porto de Galinhas, PE, 2010. p.325-334.
(Palestras).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a taxa de prenhez em receptoras bovinas criadas na Amazônia Legal apesar de baixa, indicou que o estágio de blastocisto expandido tem maior potencial para manter a prenhez do que os embriões menos desenvolvidos. No entanto, sabe-se que a proporção de embriões produzidos *in vitro* que atingem o estágio de blastocisto, em condições transferíveis, raramente é superior a 40%, o que caracteriza a PIV como um processo “ineficiente”.

Os embriões bovinos PIV, certamente, são diferentes em muitos aspectos dos embriões produzidos *in vivo*. Deve-se considerar as diferenças morfológicas, ultra-estruturais, fisiológicas e metabólicas, nos níveis de transcrição, que existem entre o embrião PIV e o produzido *in vivo*. Isto sugere que há variáveis que devem ser identificadas nos embriões PIV, cujas características os aproximam dos embriões produzidos *in vivo*.

Há evidências da influência significativa de origem folicular no potencial de oócitos se desenvolverem, pois, uma vez que o oócito é aspirado do folículo, sua capacidade de desenvolvimento torna-se limitada. Embora as condições de cultura no processo PIV, em bovinos, possa impactar o potencial do desenvolvimento do embrião, destaca-se a importância da qualidade intrínseca do oócito como fator chave que determina a proporção de oócitos que atingirão o estágio de blastocisto.

A inovulação a fresco de embriões PIV em receptoras com diferença de ± 24 horas de sincronização, entre o momento da FIV e a detecção do estro, sem prejuízo para a taxa de prenhez, apresenta-se como um bom recurso para evitar perdas de embriões pela falta de receptoras sincronizadas. Considerando a falta de correlação entre tipos de corpo lúteo e a taxa de prenhez, inferem-se que as receptoras possam ser selecionadas apenas pelo fato de terem apresentado cio e ovulação.

Observou-se que na região da Amazônia Legal, por ser um complexo bioma, apresenta características climáticas que permitem a manutenção da prenhez de embriões PIV, sem a interferência da temperatura e da umidade.

Portanto, percebe-se que, mais pesquisas devem ser realizadas no intuito de melhorar o desenvolvimento do oócito e conseqüentemente, a produção de embriões de qualidade, ampliando o conhecimento e dessa forma otimizando a utilização da PIV. Isso possibilitará a difusão desta tecnologia visando o aumento da produtividade da pecuária nacional, além de subsidiar outras biotécnicas, como a transferência nuclear e a transgênese.