

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES  
EM DOADORAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*).**

**Marcos Brandão Dias Ferreira**

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil  
Dezembro de 2011  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES  
EM DOADORAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*).**

**Marcos Brandão Dias Ferreira  
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil  
Dezembro de 2011**

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**MARCOS BRANDÃO DIAS FERREIRA** – nascido em Rio de Janeiro RJ, aos 20 dias do mês de dezembro de 1956; concluiu o Ensino Médio no Pitágoras em Belo Horizonte MG, o Primeiro e Ginásio na escola Nossa Senhora do Rosário na cidade de Brasília, em março de 2003, concluiu o Curso Superior em Medicina Veterinária em dezembro de 1980; ingressou, em março de 1979, no curso de pós-graduação, em nível de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração Reprodução Animal, na UFMG e ingressou em março de 2008, no Doutorado do Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV- UNESP-Jaboticabal com bolsa da FAPEMIG.

**DEDICO ESTE TRABALHO**

**A MINHA ESPOSA, BEATRIZ PELO INCENTIVO E COMPANHEIRISMO.**

**A MEUS PAIS (*In memoriam*), ANTONIO CARLOS E MITZI PELO AMOR E ORIENTAÇÃO.**

**AOS MEUS FILHOS, MARIANA, VICTOR E RODRIGO, PELA ENERGIA E ESTÍMULO PARA CONTINUAR.**

**AOS MEUS IRMÃOS ANDRÉ, PAULO E TIAGO, E AS MINHAS IRMÃS BEATRIZ, CECÍLIA, FÁBÍOLA E REBECA, PELA CONVIVÊNCIA E AMIZADE.**

**AOS AMIGOS E COMPANHEIROS (*In memoriam*) QUE ME ACOMPANHARAM E AJUDARAM GOSTAR E CONHECER AS VACAS: IRINEU, ZÉ PRETO, JOSIAS E XICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família: pela dedicação, amor, paciência e carinho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Ao professor orientador Joaquim Mansano Garcia, pela confiança, oportunidade e ensinamentos transmitidos.

A TECGENE em especial ao Paulo Vagnini e Alan Garcia.

Aos Veterinários Mateus, Flavio, Neto, Douglas e Nicolas pelo enorme apoio nos trabalhos de campo.

As Veterinárias Karina, Marina, Bruna e Mariana pela enorme ajuda nos trabalhos de laboratório.

Ao amigo Camisão pelas análises.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e da UNESP.

Meus colegas de pós-graduação.

A EPAMIG pela oportunidade.

Aos colegas de trabalho da EPAMIG que me ajudaram no campo.

A FAPEMIG pelo suporte financeiro.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP, em especial, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e à Pós-graduação, pela oportunidade.

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO I	
PARÂMETROS GERAIS SOBRE A OBTENÇÃO DE OÓCITOS, PRODUÇÃO DE EMBRIÕES E PREENHEZES COM DOADORAS LACTANTES DA RAÇA GIR ( <i>Bos taurus indicus</i> ) EM PROGRAMA DE PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> .	1
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. FOLÍCULOGÊNESE, CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS.	4
2.2. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIV)	8
2.3. MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR	15
2.3.1 ASPIRAÇÃO DO FOLÍCULO DOMINANTE	15
2.3.2 INTERAÇÃO REPRODUÇÃO E NUTRIÇÃO	16
2.3.3 ENDOCRINOLOGIA E ANESTRO PÓS-PARTO	19
2.4 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL (ECC)	25
2.4.1 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL E QUALIDADE DE OÓCITOS	30
2.4.2 DIETA E QUALIDADE DE OÓCITOS	30
2.5 SENESCÊNCIA	34
2.5.1 SENESCÊNCIA REPRODUTIVA	36
2.6 ALTERAÇÕES NO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO- OVARIANO	40
2.7 DNA MITOCONDRIAL	44

## CAPITULO 2.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDAS OU NÃO A ABLAÇÃO DO FOLÍCULO DOMINANTE PRÉ ASPIRAÇÃO FOLICULAR. 47

1. INTRODUÇÃO. 47

2. REVISÃO DE LITERATURA 48

3. OBJETIVOS 54

4. HIPÓTESES 54

5. MATERIAL E MÉTODOS 55

5.1. LOCAIS 55

5.2. CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA DE PRODUÇÃO 55

5.2.1 MANEJO DAS DOADORAS 55

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 57

5.4. TRATAMENTOS 57

5.5. ASPIRAÇÃO FOLICULAR PARA OBTENÇÃO DOS OÓCITOS 60

5.6. TRANSPORTE, LAVAGEM E SELEÇÃO DOS OÓCITOS. 60

5.7. MATURAÇÃO *IN VITRO* 61

5.8. FECUNDAÇÃO *IN VITRO* 62

5.9. CULTIVO *IN VITRO* (CIV) 62

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 63

7. RESULTADOS 64

8. DISCUSSÃO 72

9. CONCLUSÕES 82

## CAPITULO 3

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E PREENHEZ DE DOADORAS DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*) SEGUNDO A ÉPOCA DA ASPIRAÇÃO, A IDADE, DNA MITOCONDRIAL DA VACA E O EFEITO DO TOURO. 83

1. INTRODUÇÃO 83

2. REVISÃO DE LITERATURA 85

3. OBJETIVOS 95

4. HIPÓTESES	95
5. MATERIAL E MÉTODOS	96
5.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS TRABALHOS	96
5.2. ANIMAIS	96
5.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR, MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i>	97
5.4. INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES	98
5.5. CONFIRMAÇÃO DA PREENHEZ E DA PATERNIDADE	98
5.6. ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL	99
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	100
6. RESULTADOS.	101
7. DISCUSSÃO	107
8. CONCLUSÕES	117
9. REFERÊNCIAS	118
10. ANEXOS.	155

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1 – Características de produção e reprodução das vacas Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ) utilizado no experimento.	64
Tabela 2 – Número de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração das vacas da raça Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	65
Tabela 3 – Desempenho por categoria animal (primíparas e múltiparas) das vacas Gir avaliadas nas características de; peso vivo (kg), escore da condição corporal (ECC), produção de leite (kg) durante o período experimental e dias de manifestação do primeiro cio pós parto. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (DP).	65
Tabela 4 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nas classes de dias pós-parto, nas classes do mês de aspiração folicular, nas classes da ordem de parto, e das ordens de aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	66
Tabela 5 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nas classes de escore corporal (CECC) alto ou baixo. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	68
Tabela 6 – Número de oócitos totais, viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração de doadoras Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	70
Tabela 7 - Proporção média por sessão de aspiração nas doadoras dos tratamentos de ablação do folículo dominante e grupo controle, de blastocistos produzidos em relação ao número de oócitos total e viáveis aspirados. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	71
Tabela 8 - Proporção média por sessão de aspiração nas doadoras de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, no mês de aspiração folicular. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	71
Tabela 9 – Desempenho fenotípico do rebanho Gir utilizado no experimento 2 nas características de produção.	101
Tabela 10– Número de oócitos viáveis, embriões e prenhez na produção <i>in vitro</i> das doadoras Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ) e taxa de conversão com sêmen sexado para cromossomo X de touros da raça Gir.	102

Número mínimo, máximo, médias e desvio padrão e coeficiente de variação

Tabela 11 – Número de oócitos viáveis, embriões e prenhez, de acordo com as classes de idade das doadoras da raça Gir. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias.	102
Tabela 12 - Efeito da ordem de aspiração folicular sobre o numero de embriões por aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias.	104
Tabela 13 - Efeito do mês e ano da aspiração folicular sobre o número de oócitos viáveis, embriões e prenhez. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias.	104
Tabela 14 - Efeito da fertilização <i>in vitro</i> de sêmen sexado para cromossoma X, nos touros da raça Gir, sobre o numero de embriões, prenhez e taxa de conversão oócito/embrião por aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias.	105
Tabela 15 - Comparação do desempenho na PIV entre as linhagens citoplasmáticas <i>B. taurus</i> e <i>B. Indicus</i> das doadoras da raça Gir. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	106
Tabela 16 - Composição mínima da ração experimental.	155
Tabela 17 - Níveis minerais mínimos/ kg de sal mineral utilizado no experimento.	155
Tabela 18 – Resultado individual por aspiração, da produção <i>in vitro</i> de oócitos totais e viáveis, de embriões, da relação oócitos totais e oócitos viáveis, e da conversão de oócitos em embriões, no pós-parto de oito vacas doadoras da raça Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ) do rebanho experimental.	158
Tabela 19 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nos grupos de vaca (GR) classificadas por: tratamentos de ablação do folículo dominante pré-aspiração folicular (ABLA) ou grupo controle, dentro dos nas classes de escore corporal (CECC) alto ou baixo, e nas classes de ordem de parto: das primíparas e múltíparas. Os números são médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão das médias (EPM).	159

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 – Distribuição das vacas Gir lactantes nos grupos de tratamentos de ablação do folículo dominante (AFD) <i>versus</i> grupo controle, e subgrupos acordo com o início de aspiração no pós parto de 14 ou 28 dias.	59
Figura 2 – Regressão do número de oócitos totais aspirados (TOT) e dias pós parto da aspiração (DPP) de doadoras lactantes da raça Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	67
Figura 3 – Regressão do número de oócitos viáveis aspirados (VIÁV) e dias pós parto da aspiração (DPP) de doadoras lactantes da raça Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	67
Figura 4 – Regressão do número de oócitos viáveis aspirados e escore corporal ao parto de doadoras lactantes da raça Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	68
Figura 5 - Regressão do número de oócitos viáveis em relação a idade de vacas da raça Gir ( <i>Bos indicus</i> ).	103
Figura 6 – Figuras dos escores da condição corporal (ECC) de vacas Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	157

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1: Descrição do escore da condição corporal (ECC) de vacas Gir ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	156

**Lista de abreviaturas e siglas.**

**AFD** = Aspiração do folículo dominante contagem de folículos antrais

**AFC** = Contagem de folículos antrais

**AGNE** = Ácidos graxos não esterificados

**b** = Espécie bovina

**BE** = Benzoato de estradiol

**BEN** = Balanço energético negativo

**BSA** = Albumina sérica bovina

**CE** = Ciclo estral

**CIV** = Cultivo in vitro

**CL** = Corpo lúteo

**COCs** = Complexo cumulus-oócitos

**DP** = desvio padrão

**DPPC** = Classe de dias pós parto

**DNAm** = DNA mitocondrial

**e** = Espécie eqüina

**E<sub>2</sub>** = Estradiol 17 $\beta$

**eCG** = Gonadotrofina coriônica eqüina.

**ECC** = Escore da condição corporal

**EGS** = Escore da gordura sucutânea

**EL** = Energia líquida

**EPM** = Erro padrão das médias

**FD** = Folículo dominante

**FIV** = Fecundação *in vitro*

**FSH** = Hormônio folículo estimulante

**GnRH** = Hormônio liberador de gonadotrofinas

**h** = Espécie humana

**hCG** = Gonadotrofina coriônica humana

**hMG** = Gonadotrofina da menopausa humana

**IDC** = Classe de idade

**IGF-1** = Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

**IM** = Via intramuscular

**IP** = intervalo de partos

**KG** = kilogramas

**L** = Litro

**LH** = Hormônio luteinizante

**mg** = Miligramas

**MHz** = Mega hertz

**MIV** = Maturação *in vitro*

**mL** = Mililitros

**mm** = Milímetros

**mM** = Miliosmol

**mmHg** = Milímetros de mercúrio

**MOET** = Multiple ovulation embryo transfer – Programa de melhoramento animal que utiliza a FIV com sêmen sexado

**MS** = matéria sêca

**NaCl** = Cloreto de sódio

**o** = Espécie ovina

**OPU** =(ovum pick-up)-punção folicular

**p** = Espécie porcina

**PBS** = Tampão fosfato salina

**PIV** =Produção in Vitro de embriões

**P<sub>4</sub>** = Progesterona

**PGF<sub>2</sub>α** = Prostaglandina F<sub>2</sub>α

**SFB** = Soro fetal bovino

**SOF** = Sintetic oviduct fluid

**TCM** = Tissue culture media

**TE** = Transferência de embrião

**UI** = Unidade internacional

**US** = Ultra-som ou ultrassonografia

**USA** = Estados Unidos da América

**μL** = micro-litro **μg** = micro-grama

## **OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM DOADORAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*).**

### **RESUMO**

Raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e seus cruzamentos têm papel fundamental na pecuária brasileira, e a raça Gir, em especial, acrescenta rusticidade e produtividade nas suas descendentes leiteiras. A Produção *in vitro* de embriões bovinos é uma biotécnica de alto valor econômico, que, aliada à utilização de sêmen sexado para cromossoma X, possibilita a multiplicação com fêmeas de valor genético superior. Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar a produção *in vitro* (PIV) de embriões de doadoras da raça Gir na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Uberaba, MG. O experimento 1 (EXP 1) visou verificar o efeito da ablação do folículo dominante sobre os resultados da PIV. No experimento 2 (EXP 2) os efeitos da estação do ano, idade da doadora, DNA mitocondrial materno e efeito do touro sobre a PIV foram estudados. No EXP 1, 42 multíparas e primíparas foram submetidas à aspiração de oócitos (OPU) a partir dos 15 dias pós-parto e a intervalos de 21 dias, sendo efetuada (65 sessões de OPU) ou não (115 sessões de OPU) a ablação do folículo dominante 3 dias antes da aspiração. Das 198 aspirações realizadas foram coletados 3.884 oócitos viáveis, que resultaram em 1.114 blastocistos. O número médio de oócitos viáveis aspirados e de blastocistos por sessão foi de  $20,0 \pm 10,6$  e de  $5,70 \pm 4,9$ , respectivamente. Não foram identificados efeito da ordem de parto e aspiração, do dia após o parto para início da coleta e da condição corporal da doadora nos resultados da PIV. No entanto, a produção de blastocistos por sessão foi superior ( $5,65 \pm 1,02$  vs.  $3,78 \pm 0,97$ ) nas vacas que sofreram ablação do folículo dominante ( $p < 0,05$ ). No EXP 2 foram avaliadas 363 aspirações de 85 doadoras fertilizadas com 23 touros diferentes que geraram 6.084 oócitos viáveis, 2.537 embriões, 1.105 gestações, 41,7% de taxa de fertilidade no dia 30 e uma taxa de concepção de 39,5% aos 60 dias após a inovulação (1.002 prenhez). O número de oócitos viáveis por aspiração ( $16,8 \pm 10,7$ ) foi influenciado pela idade da doadora, sendo registrada a queda de 0,89 estruturas por ano de idade da vaca ( $p < 0,05$ ) e pela linhagem citoplasmática da doadora, sendo que fêmeas com DNA mitocondrial

(DNAm) *indicus* produziram menos oócitos viáveis ( $16,1 \pm 0,99$ ) que as DNAm *taurus* ( $21,6 \pm 1,37$ ) ( $p < 0,05$ ). Tanto o número de embriões ( $6,86 \pm 5,3$ ) quanto o número de prenhez por aspiração ( $3,15 \pm 3,0$ ) foram influenciados pela classe de idade da doadora e pelo mês da aspiração, sendo que fêmeas com menos de 11 anos produziram mais prenhezes do que as com idade superior a esta ( $p < 0,05$ ). Os meses de setembro e outubro foram os que proporcionaram mais prenhezes, nas receptoras, em resposta a PIV ( $p < 0,05$ ). A taxa de conversão de oócito em embrião foi influenciada ( $p < 0,05$ ) pelo touro utilizado na fertilização, variando de 2,6 a 57,1 %, dependendo do touro. Concluiu-se que vacas lactantes da raça Gir podem ser aspiradas a partir 14 dias pós-parto, a intervalos de 21 dias, proporcionando grande quantidade de oócitos viáveis e embriões. Também concluiu-se que, embora haja efeito individual de touro (sêmen sexado para cromossomo X) no processo de fertilização *in vitro*, a ablação do folículo dominante pré aspiração aumenta a eficiência da PIV, que fêmeas com até 10 anos são melhores doadoras e, que, o mês de aspiração pode influenciar as taxas de gestação.

**Palavras chave:** sêmen sexado, idade, época do ano, ablação do folículo dominante, zebu

## OOCYTE RETRIEVAL AND *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION FROM LACTATING GYR (*Bos taurus indicus*) DONORS.

### ABSTRACT

Zebu breeds (*Bos taurus indicus*) and its crosses have an essential role on the Brazilian cattle industry, and the Gyr breed, especially, incorporates hardiness and productivity onto its dairy descendants. The *in vitro* production of bovine embryos is a biotechnique of high economic value, which, combined to the use of sex-sorted semen bearing X chromosomes, allows for the multiplication of superior genetic value dams. Two experiments were conducted to evaluate the *in vitro* production (IVP) of embryos from Gyr donor cows at the EPAMIG Research Farm in Uberaba, MG, Brazil. Experiment 1 (EXP 1) aimed to verify the effect of ablation of the dominant follicle on IVP results. In experiment 2 (EXP 2), the effects of season, donor age, mitochondrial DNA and sire on IVP were studied. In EXP 1, 42 multiparous and primiparous cows underwent ovum pick up (OPU) after removal (65 OPU sessions-DFR) or non removal (115 OPU sessions- Control) of the dominant follicle 3 days before aspiration, starting from 15 days postpartum at approximately 21 day-intervals. Of the 180 OPU sessions performed, 3,884 viable oocytes were collected, which resulted in 1,114 blastocysts. The overall average numbers of oocytes aspirated and viable blastocysts per session were  $20.0 \pm 10.6 \pm 4.9$  and  $5.70$ , respectively. OPU session, parity, calving to OPU interval and donor body condition did not influence IVP results. However, the production of blastocysts per session was higher ( $5.65 \pm 1.02$  vs.  $3.78 \pm 0.97$ ) in DFR-cows ( $P < 0.05$ ). In EXP 2, a total of 363 OPU sessions from 85 donors was studied. Semen from 23 different bulls was used for *in vitro* fertilization, yielding 6,084 viable oocytes, 2,537 embryos and 1,105 pregnancies overall. Thirty and sixty-day pregnancy rates after embryo transfer were 41.7% and 39.5%, respectively. The number of viable oocytes per OPU session ( $16.8 \pm 10.7$ ) was influenced ( $P < 0.05$ ) by donor age, such that, a drop of 0.89 per year of age was observed. Viable oocyte number was also influenced by donor cytoplasmic lineage, such that, females with *indicus* mitochondrial DNA (mDNA) produced fewer viable ( $P$

<0.05) oocytes ( $16.1 \pm 0.99$ ) than those with *taurus* mtDNA ( $21.6 \pm 1.37$ ). The total number of embryos ( $6.86 \pm 5.3$ ) and pregnancies per OPU session ( $3.15 \pm 3.0$ ) were influenced by donor age and OPU-month. The class of donors under 11 years of age produced more pregnancies than the older class ( $P < 0.05$ ). More pregnancies ( $P < 0.05$ ) were observed from OPU sessions done on September and October, compared to those of the remaining months. The overall oocyte to embryo conversion rate was 41.7% and was influenced ( $P < 0.05$ ) by the bull used, ranging from 2.6 to 57.1%. It was concluded that lactating Gyr cows may be submitted to OPU from 14 days postpartum on, at 21 day-intervals, providing large quantities of viable oocytes and embryos. Additionally, it may be concluded that, although there is an effect of sire in the in vitro fertilization process, ablation of the dominant follicle prior to OPU increases IVP efficiency, cows up to 10 years old are better donors and the month when OPU is performed may alter gestation outcome.

**Keywords:** sex-sorted semen, age, zebu, dominant follicle ablation, cow

## **CAPITULO I**

### **PARÂMETROS GERAIS SOBRE A OBTENÇÃO DE OÓCITOS, PRODUÇÃO DE EMBRIÕES E PRENHEZES COM DOADORAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*) EM PROGRAMA DE PRODUÇÃO *IN VITRO*.**

#### **1. INTRODUÇÃO.**

O Brasil é detentor do maior rebanho comercial bovino do mundo. Entretanto, a pecuária nacional ainda encontra-se em desenvolvimento, e o país, apesar de estar entre os maiores produtores mundiais de carne, e possuir o maior potencial para ser grande exportador de leite e derivados, possui baixa taxa de desfrute. Ao analisar o rebanho, de 200 milhões de cabeça, verifica-se por várias razões, tanto estruturais quanto de conjuntura, que o efetivo do rebanho bovino brasileiro está diminuindo. Porém, a demanda por proteína animal crescente torna o aumento de produtividade vital para o setor de bovinocultura e interessante do ponto de vista técnico e econômico. O modelo de criação dominante, as precárias condições de exploração e o baixo nível tecnológico empregado, são os principais motivos da baixa eficiência reprodutiva de nossas matrizes e conseqüentemente, de sua baixa produtividade. Além disso, para o desenvolvimento de estratégias que melhorem o desempenho reprodutivo de raças *Bos indicus* é necessário compreender melhor a fisiologia reprodutiva e suas implicações nos programas de melhoramento animal.

As raças Zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação da pecuária brasileira, representando cerca de 80% do efetivo bovino nacional (GOMES, 2006). A raça Gir exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, sendo ainda eficiente na produção de leite a baixo custo, principalmente quando utilizada em cruzamentos com animais de raças especializadas para a produção leiteira, sendo por isso uma das principais raças Zebuínas utilizadas para esse fim. O Estado de Minas Gerais possui um rebanho bovino com cerca de 20 milhões de cabeças produzindo anualmente 7 bilhões de litros de leite e 800 mil toneladas de carne bovina “equivalente carcaça” (ANUALPEC, 2010). Os rebanhos da raça Gir,

componentes do ápice dessa estratificação piramidal ou rebanhos núcleo, devem ser submetidos a um trabalho de melhoramento e seleção sério e rigoroso, para a produção de reprodutores e material genético (sêmen e embriões) de qualidade superior a serem utilizados nos rebanhos mestiços (ALMEIDA & PIRES, 2004).

A Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) é uma biotécnica de interesse econômico, que aliada a utilização de sêmen sexado possibilita a obtenção de fêmeas de valor genético superior (GARCIA et al, 2003; BARUSELLI et al., 2006; CAMARGO et al., 2006). O desenvolvimento da metodologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) para maximizar o ganho genético e a produção animal a um custo baixo é um desafio de pesquisa científica há vários anos, e a produção em escala comercial de embriões a partir de oócitos puncionados dos folículos ovarianos pode aumentar os benefícios do progresso genético entre gerações e contribuir para os programas de melhoramento genético ou produção animal (RUMPF, 2007).

A tecnologia de transferência de embriões em doadoras Zebuínas leiteiras pelos métodos convencionais através de protocolos de superovulação e coleta de embriões, aplicados após a vaca findar a lactação, não permitia a continuidade da vida produtiva da matriz. A técnica empregada comercialmente de transferência de embriões coletados após superovulação tem como limitante o número de embriões produzidos e o número de protocolos aplicados a doadora. A variabilidade da resposta ovariana nos diferentes tratamentos superovulatórios, tais como droga, dosagem, duração e protocolos, interfere nos resultados, assim como fatores inerentes a fisiologia da doadora como, idade, época do ano, estado nutricional e histórico reprodutivo (BO et al., 2002). Em função destas limitações a PIV incluindo aspiração folicular (OPU), maturação, fertilização e cultivo embrionários, é um exemplo de avanço rapidamente incorporado ao setor produtivo, e que resulta em avanços significativos para a pecuária nacional, demonstrando a importância do investimento em pesquisa e desenvolvimento tecnológico nesta biotecnologia (GARCIA et al, 2005; VIANA & CAMARGO, 2007).

Portanto a pressão para redução do intervalo de gerações, os programas de melhoramento com avaliação somente de primíparas e a criação de núcleos

MOET nas raças Zebuínas, tem pressionado criadores e técnicos em direção a alternativa de emprego das biotecnologias da reprodução para multiplicação das fêmeas superiores, principalmente com vacas lactantes e jovens. A multiplicação de fêmeas jovens superiores da raça Gir, aprovadas em núcleo MOET, recordistas de lactação na primeira e segunda cria, embora ainda estejam ampliando suas melhores lactações até atingirem a produção máxima por volta da quarta ou quinta cria, devem ser exploradas com as modernas ferramentas da reprodução, sem que ocorra interferência em sua vida reprodutiva normal de intervalos entre 12 a 14 meses e lactações de 270 a 330 dias. Além disso, a utilização de doadoras da raça Gir para produção de embriões F1 com raças taurinas leiteiras especializadas já é realidade no mercado de genética nas bacias leiteiras tradicionais e emergentes (BASSO et al., 2010).

Programas de produção *in vitro* que iniciem os protocolos de aspiração o mais próximos do parto, e que permitam aspirações seqüenciais não interferindo na reconcepção da doadora para uma próxima lactação, são de grande interesse científico e produtivo. O presente trabalho pesquisou a produção *in vitro* (PIV), utilizando doadoras da raça Gir (*Bos taurus indicus*), visando identificar possíveis diferenças no desempenho da doadora, em relação ao período de dias pós-parto para início das aspirações, na ablação do folículo dominante pré aspiração, e a influência da idade e do DNA mitocondrial da doadora.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. FOLÍCULOGÊNESE, CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS.

Na fase fetal dos bovinos ocorre o início da folículogênese, com as células germinativas primordiais originando-se no saco vitelino e migrando para a gônada em formação, e em seguida, as células germinativas multiplicam-se por mitose e originam grupos de oogônias, conectados entre si por interações citoplasmáticas. Nesta etapa, células somáticas do mesonefro circundam as oogônicas, formando os cordões corticais, precursores dos folículos primordiais. Em uma primeira etapa de diferenciação, são constituídas as células da pré-granulosa a partir das células mesonéfricas. Por sua vez, as oogônias diferenciam-se em oócitos, os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais (SENEDA & BORDIGNON, 2007). Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, que é interrompido na prófase da meiose I, no estágio de diplóteno. Esta quiescência persiste até o recrutamento folicular, seja este no início da puberdade ou nos últimos dias da fase reprodutiva da fêmea (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Coincidindo com o início da meiose, os folículos primordiais individualizam-se a partir dos cordões corticais, caracterizando-se por uma camada de células granulosas pavimentosas circundando o oócito. Nesta etapa da folículogênese, há degeneração de um expressivo número de folículos primordiais, sendo a parcela remanescente denominada como população de reserva de folículos ou *pool* folicular. Uma vez constituída esta população folicular, alguns folículos primordiais são regularmente recrutados, aparentemente obedecendo à uma cronologia conforme sua formação. Desta forma, o processo de recrutamento folicular ocorre até o término da vida reprodutiva da fêmea (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Dentre os fatores mais estudados no mecanismo de recrutamento nas primeiras modificações foliculares, encontram-se o Kit Ligand (PARROT & SKINNER, 1999), GDF-9 (VITT et al., 2000), bFGF (NILSSON et al., 2001) e LIF (NILSSON et al., 2002). Uma vez recrutado, o folículo primordial passa a folículo primário, cujas células granulosas apresentam formato cubóide. Uma

característica marcante dessa fase é o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida por todo o desenvolvimento folicular. Uma recente descoberta associou variações genéticas nas proteínas da zona pelúcida com resultados insatisfatórios na produção *in vitro* de embriões, criando novas perspectivas na avaliação dessa estrutura nos oócitos (MANNIKKO et al. 2005). Com o crescimento do oócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca e pelo menos duas camadas da granulosa, o folículo secundário encontra-se constituído. Durante o processo de formação do folículo secundário, alguns marcadores têm sido reportados como de grande importância, tais como ativina-A (ZHAO et al. 2001), EGF (VAN DEN HURK et al., 2000) e BMP-15 (JUENGEL et al., 2002). Ao fim deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada, sendo então iniciados os efeitos amplos do FSH e LH (VAN DEN HURK et al., 2000). Alguns marcadores, como ativina - A e sua proteína de ligação folistatina foram identificados desde o estágio de folículo primordial até grandes folículos antrais (SILVA et al., 2004). A etapa seguinte do desenvolvimento consiste no folículo terciário, cuja distinção do anterior ocorre pela multiplicação das camadas da granulosa, além da organização completa das células da teca. O FSH tem se revelado como agente fundamental, não apenas pela sua ação endócrina conhecida, mas também pelo seu envolvimento na ação parácrina de fatores de crescimento, como relatado para membros do grupo FGF, como o FGF-8 (BURATINI et al., 2005). Um grande evento fisiológico, a formação do antro, representa um marco importante no estudo do crescimento folicular, pois é precursor dos processos de desvio e dominância folicular. Tais etapas têm sido bastante estudadas, e resultados interessantes sobre a interação do LH e seu receptor foram recentemente descritos (NOGUEIRA et al., 2007). Além de representar a fase de mais intensa ação gonadotrófica, a presença do líquido folicular viabiliza os estudos ultra-sonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* até o destino final do folículo: atresia ou ovulação, além de permitir sua visualização e a aspiração para cultivo *in vitro* (SENEDA & BORDIGNON, 2007).

O ciclo estral nos bovinos varia de 17 a 25 dias, com semelhança entre taurinos e Zebuínos (BARROS et al., 1995; SIROIS & FORTUNE, 1988). Nas

raças de origem Européia (*Bos taurus taurus*) a duração do ciclo estral é de  $21 \pm 3,7$  dias para vacas e  $20 \pm 2,3$  dias para novilhas (WRIGHT & MALMO, 1992), enquanto que em raças de origem Indiana (*Bos taurus indicus*) varia de 17 a 24 dias (MUKASA-MUGERWA, 1989; GALINA & ARTHUR, 1990; PINHEIRO et al., 1998). Neste intervalo considerado normal, o desenvolvimento folicular se apresenta como uma sequência dinâmica de eventos fisiológicos e endocrinológicos que envolvem o crescimento e a atresia dos folículos antrais, em movimentos denominados de ondas foliculares (PIERSON & GHINTER, 1984). Este desenvolvimento folicular ovariano ocorre em uma série de ondas sucessivas, sendo que cada onda de crescimento folicular consiste de um grupo de folículos recrutados de um pool de folículos antrais gonadotropina dependentes. Caso não ocorra a ovulação de um destes folículos, inicia-se o processo de atresia e nova onda de crescimento folicular emerge. Possivelmente, durante o recrutamento, o folículo dominante seja aquele cujo estágio de desenvolvimento estaria melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico, tornando-o mais responsável a estímulos endócrinos. Com o advento da ultrassonografia, técnica de avaliação não invasiva e em tempo real, outros trabalhos comprovaram que o crescimento dos folículos dava-se em forma de ondas, e que cada ciclo tinha de duas a quatro ondas (PIERSON & GHINTER, 1988; SAVIO et al., 1988; FORTUNE, 1988). Com o uso desta ferramenta foi possível avaliar a dinâmica folicular a associar com os eventos endocrinológicos, ao mesmo tempo do surgimento das estruturas ovarianas durante o ciclo estral (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1989; SIROIS & FORTUNE, 1988).

O desenvolvimento folicular tem sido estudado principalmente em fêmeas de genótipos taurinos (GINTHER et al., 1991; ADAMS et al., 1994; EVANS et al., 1994). Porém, são escassos os estudos deste processo em animais Zebuínos (RHODES et al 1995b; FIGUEIREDO et al 1997), especialmente da raça Gir (GAMBINI et al., 1998).

O desenvolvimento folicular é regulado pela interação de fatores endócrinos e intrafoliculares, bem como por inúmeras vias intracelulares, que envolvem a transcrição de genes novos (ZIELAK et al., 2007). Os mecanismos que regulam a

seleção do folículo dominante e a regressão do folículo subordinado são focos atuais de investigação na moderna genômica. Apesar de hormônios de glândulas endócrinas desempenharem funções cruciais de regulamentação, os seus efeitos também são influenciados por fatores intraovários que agem por mecanismos de via parácrina e ou autócrina (KNIGHT & GLISTER 2003; MIHM & BLEACH 2003; RIVERA & FORTUNE 2004).

Vários estudos examinaram a expressão de diferentes genes nos folículos dos bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento. Sisco e colaboradores (2003), citam fatores como a maior expressão de inibina  $\beta$ A, receptores da apolipoproteína E2, p450 aromatase, mitógeno-ativada da proteína quinase (MAPK) quinase quinase 5 e carboxipeptidase D em células da granulosa dos folículos maiores na seleção de estágio anterior a fase de dominância. Os resultados de outro estudo (EVANS et al. 2004) que usando um microarray para cDNA bovino demonstraram que o desenvolvimento do folículo dominante foi associado à maior expressão de genes envolvidos na inibição de vias apoptóticas (aromatase, receptor do hormônio luteinizante (LH), receptor do estradiol  $\beta$ , deleted in câncer 1 (DICE-1) proteína supressora de tumor, e proteína de diferenciação mielóide celular (MCL-1) em células da granulosa. Estes autores também demonstraram que o crescimento do folículo subordinado foi associado a maior expressão de genes envolvidos nas vias apoptóticas (B-glicana, ciclo-oxigenase-1, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , caspase-activated DNase e morte associada à proteína kinase related 2 (Drak-2) em células da granulosa e  $\beta$ -glicana, caspase 13, inibidor da proteína quinase of RNA activated P58 (P58 (IPK)), apoptose fator ativador de protease-1 (Apaf-1), a família humana BTG membro 3 (BTG-3) e supressores tumorais humanas candidato B-CLL (TS-BCLL) em células da teca. MIHM e colaboradores (2006), relataram que o crescimento dos folículos coletados no início da seleção foi associado com a modulação da expressão dos genes para receptores de LH nas células da granulosa e fator de crescimentotransformante (TGF)- $\beta$ 1 induzindo fator anti apoptose nas células da teca e *downregulation* de folículo estimulante de receptores hormonais (FSH),  $\alpha$ -inibina e ativina um receptor do tipo I em células da granulosa.

Além desses achados, Zielak e colaboradores (2007), demonstraram que, no momento da emergência da onda folicular, o futuro folículo dominante tem elevadas concentrações de mRNA para aromatase e Tbc1d1, que estimulam a diferenciação celular. Logo após a seleção do folículo dominante, o folículo tem mais mRNA para aromatase, MRPL41 e Tbc1d1, que desempenham funções na produção de estradiol, apoptose e diferenciação celular, levando ao maior diâmetro e maiores concentrações de estradiol no fluido folicular nos folículos dominante em relação aos subordinados. Estes autores afirmam que na fase de dominância da onda folicular, o diâmetro do folículo e concentrações de estradiol no fluido folicular são ainda maiores no folículo dominante, bem como nas concentrações de mRNA para aromatase, receptores de LH, Tbc1d1, MRPL41 andVDAC2, que irão promover a continuidade do desenvolvimento folicular. Em contraste, o folículo subordinado possui mais mRNA para STX7 SPC22 e EHD3, que irão promover fagocitose e apoptose, levando à regressão dos folículos subordinados.

## **2.2. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV)**

A transferência de embriões bovinos (TE) no Brasil foi iniciada na década de 70, primeiramente utilizando-se embriões importados e, posteriormente, coletados no país (RUBIN, 2005). A atividade desenvolveu-se gradualmente, assumindo grande importância econômica. Nos últimos anos, a incorporação da tecnologia de produção de embriões em laboratório, conhecida por fertilização *in vitro* (FIV) ou produção *in vitro* de embriões (PIVE) alavancou o mercado da TE no Brasil. A produção de embriões cresceu significativamente, e o país tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos, já tendo alcançado aproximadamente  $\frac{1}{4}$  do total de transferências realizadas no mundo (VIANA & CAMARGO, 2007). Após um período de crescimento paralelo, a PIV passou a ocupar o espaço anteriormente dominado pela TE convencional.

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos compreende três etapas desenvolvidas no laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de

mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos ou criopreservados. A obtenção de oócitos disponíveis para PIV ocorre através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou OPU (ovum pick up), e a OPU tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (BOLS et al., 2004). A PIV mostrou ser uma alternativa à superovulação convencional para a produção de embriões, possibilitando a obtenção de maior número de gestações de uma doadora em determinado período de tempo (BOUSQUET et al., 1999), além de viabilizar o uso de doadoras refratárias aos tratamento hormonais, pré-púberes, em fase inicial de gestação ou até com alterações físicas no trato genital (BONI et al., 1997).

A PIV tem sido alvo de muitas pesquisas e estudos com o intuito de melhorar a sua utilização comercial, já que um dos principais problemas atuais da técnica é a variabilidade nos resultados do desenvolvimento *in vitro* dos embriões, uma vez que, em média, apenas 30% dos oócitos maturados se desenvolvem até o estágio de blastocisto. Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos foram realizados visando avaliar individualmente cada uma das três etapas, procurando ajustar da melhor maneira possível, todas as variáveis envolvidas no processo.

Tanto na TE quanto na PIV, ocorre grande variabilidade na produção de embriões pelas doadoras (SLENNINGL & WHEELER, 1989; GALLI et al., 2003). No entanto, a maior produção de embriões pelo procedimento *in vitro* em relação à superovulação convencional (TE) tem feito com que a maioria dos técnicos e criadores optarem pela PIV, buscando mais rapidez na produção de descendentes de vacas de linhagens superiores. A biotecnologia referente a PIV encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil alcançou posição de destaque frente ao número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica. As diferenças existentes nos diversos parâmetros da fisiologia ovariana em Zebuínos, são referentes ao número de ondas de crescimento, momento da divergência, maior número de folículos recrutados por onda, tamanho máximo, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular (RHODES et al., 1995a, FIGUEIREDO et al., 1997; DAYAN et al., 2000, SENEDA et al., 2002,

VIANA et al., 2000b, SARTORELLI et al., 2005), estes parâmetros parecem estar associados a grande variação na resposta ao tratamento superovulatório convencional em Zebuínos (BARUSELLI et al., 2006), mas determinam o maior número de folículos em crescimento nos ovários e, conseqüentemente, o maior número de oócitos recuperados (VIANA et al., 2004), quando comparado com os resultados obtidos com *Bos taurus* (WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). Considerando-se que as taxas de fertilização, clivagem, produção de blastocistos e gestações são relativamente similares entre laboratórios, diferenças no número de oócitos obtidos de cada doadora podem determinar a viabilidade desta biotecnologia (VIANA & CAMARGO, 2007). A repetibilidade no recrutamento folicular (BONI et al., 1997) é a logística mais simples na recuperação dos oócitos, quando comparada com a TE, assim como o uso de sêmen sexado (DELL'AQUA JR et al., 2006, HAYAKAWA et al., 2009), também permitem tornar a FIV mais competitiva e a biotecnologia de futuro para o melhoramento e produção animal.

A eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está diretamente relacionada a metodologia adequada, sendo que as variáveis técnicas para a obtenção de oócitos possuem considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs), e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento (BOLS et al., 1997). Outro aspecto relevante está relacionado às variações individuais entre doadoras, considerando-se peso, idade, e raça entre outros. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são freqüentes (Garcia et al 1999). Looney e colaboradores (1994), relataram a possibilidade de aspiração folicular nos animais bastante jovens, e Brogliatti & Adams (1996) obtiveram oócitos de bezerras com apenas seis semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. A origem dos oócitos pode ter um significativo impacto no seu potencial desenvolvimento *in vitro*. Animais senis produzem poucos oócitos e com baixo percentual de desenvolvimento, além da baixa qualidade devido ao pequeno número de camadas de células do *cumulus* (GARCIA et al., 1999). Parece haver um consenso quanto à condição corporal, em que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até

blastocisto (LOPEZ RUIZ et al., 1996), e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também sejam doadores de oócitos menos competentes (SENEDA et al., 2000).

A competência do oócito obtido pela aspiração folicular transvaginal parece não ser influenciada pelo tamanho do folículo (LONERGAN et al., 1994; SENEDA et al., 2001), mas o mesmo não ocorre em relação à taxa de recuperação, que demonstrou ser significativamente superior para folículos menores ou iguais a 4 mm (SENEDA et al., 1999) e já foi demonstrado que folículos menores viabilizam recuperação oocitária mais eficiente (SENEDA et al., 2001). Pavlock e colaboradores (1992), também observaram melhor desempenho na produção de blastocistos quando foram aspirados oócitos de folículos médios (2-4 mm) e grandes (4-8 mm) e utilizados em comparação a oócitos aspirados de folículos pequenos (1-2 mm). Hendriksen e colaboradores (2000), concluíram que a competência para o desenvolvimento *in vitro* é maior para oócitos oriundos de folículos maiores que 6-8 mm quando comparado com folículos de 3-6 mm. No entanto, Carolan e colaboradores (1996), não observaram influência do tamanho folicular sobre a maturação do oócito. Resultado similar foi obtido por Seneda e colaboradores (2001), avaliando oócitos oriundos de folículos pequenos (<4 mm) e grandes (>4 mm) aspirados *in vivo*.

Em função do estágio do desenvolvimento folicular, Machatkova e colaboradores (1996), demonstraram que oócitos aspirados nos dias 14 a 16 do ciclo estral apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento embrionário quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9, e outro trabalho, concluiu que o desenvolvimento até blastocisto foi significativamente maior em oócitos colhidos durante a fase de crescimento folicular independente do diâmetro do folículo, porém a competência oocitária tendeu a aumentar em oócitos oriundos de folículos maiores (HAGEMANN, 1999). Por outro lado, em relação a onda folicular, Vassena e colaboradores (2003), demonstraram que a aspiração folicular nos dias 2 ou 3 da nova onda folicular (próximos da divergência folicular) proporcionaram baixa produção de blastocistos possivelmente devido à menor competência oocitária e que o melhor momento

para recuperação seria no dia 5 (VASSENA et al., 2003), entretanto em trabalhos mais recentes não houve diferença na produção de blastocistos quando os oócitos foram aspirados nos dias 2, 3 ou 5 (HENDRIKSEN et al., 2004, MACHATKOVÁ et al., 2004). Por outro lado, nas fases mais avançadas do período de dominância, nos dias 7 ou 8, aqueles autores observaram queda na produção, concluindo que neste período o estágio avançado de atresia compromete a competência oocitária nos folículos subordinados (VASSENA et al., 2003, MACHATKOVÁ et al., 2004, HENDRIKSEN et al. 2000, 2004). Em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) aspiradas nos dias 3 e 5 da onda folicular, o número total de oócitos e a porcentagem de blastocistos foram maiores do que os aspirados nos dias 7 e 9 (MELO, 2008).

Quanto ao intervalo das aspirações, menores taxas de recuperação e de blastocisto são observadas quando a OPU é realizada semanalmente em comparação com OPU a cada 3-4 dias (GOODHAND et al., 1999). Possivelmente a alta frequência nas aspirações previna o estabelecimento do folículo dominante (HENDRIKSEN et al., 2000). Por outro lado, o cultivo com outras células (STOCK & SMITH, 1996) quando foram utilizados COC's de folículos grandes para maturar oócitos aspirados de folículos pequenos, estes autores observaram que a taxa de blastocisto foi semelhante às obtidas de oócitos de folículos grandes (6-9 mm), demonstrando que fatores parácrinos secretados pelo oócito e ou células do *cumulus* durante a maturação final são importantes para o desenvolvimento do embrião.

Os oócitos aspirados para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em diversas fases do ciclo estral, portanto, expostos a variadas concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH. Estes fatores podem afetar a competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro* (WIT et al., 2000). Chaubal e colaboradores (2007), propuseram a utilização de tratamentos hormonais para aumentar a taxa de recuperação e a qualidade de oócitos. Estes autores testaram a associação de progesterona em associação com a aplicação de FSH exógeno para crescimento

folicular, e uso de um pico de LH exógeno seis horas antes da aspiração folicular para induzir a maturação oocitária *in vivo*.

Vários protocolos de superestimulação ovariana, com o uso de gonadotrofinas (FSH, PMSG ou eCG e r-bST), têm sido estudados visando aumentar a eficiência desta biotecnologia (MEINTJES et al., 1995; BOLS et al., 1998; ROOVER et al., 2005; PIETERSE et al., 1992; SENEDA et al., 2005). Roover e colaboradores (2005), consideraram que a aplicação exógena de FSH foi capaz de aumentar o tamanho dos folículos, mas não houve alteração quantitativa, atribuindo a este último aspecto, como variação individual. As vantagens da estimulação folicular esperadas são de que maior número de folículos resultariam em mais oócitos (ROOVER et al., 2005). No entanto, apesar dos protocolos pré-aspiração promoverem aumento de tamanho dos ovários, tornando mais fácil sua manipulação (TECHAKUMPHU et al., 2004), e ainda proporcionarem maior número de folículos viáveis por aspiração, a eficiência da recuperação dos oócitos diminuiu com o uso do FSH ou bST (BOLS et al., 1998; PIETERSE et al., 1992; WALTON et al., 1993). Supõe-se que os folículos com diâmetros maiores produzidos por estes protocolos poderiam induzir menor eficiência da recuperação oocitária devido aos seguintes aspectos: maior pressão intrafolicular, fluido folicular mais viscoso e em maior quantidade, o que dificultaria a aspiração (SENEDE et al., 2001). Pieterse e colaboradores (1991) e Goodhand e colaboradores (1999), relataram melhor recuperação quando predominavam folículos pequenos no ovário e menos oócitos por sessão quando havia predomínio de folículos maiores que seis milímetros.

A relação inversa entre maior diâmetro folicular e taxa de recuperação de oócitos por sessão tem sido justificada de diversas formas, como alterações morfológicas no complexo *cumulus oophorus* (BOLS et al., 1998), viscosidade do fluido folicular (GOODHAND et al., 1999) e quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular (SENEDE et al., 1999). Apesar dos folículos maiores que 5 mm serem aspirados mais facilmente, a aspiração de folículos pequenos mostrou-se mais eficiente quanto à captação dos oócitos (SENEDE et al., 2001). Assim, a estratégia mais eficiente para associar utilização de FSH e presença de folículos

pequenos é controlar o período de crescimento folicular, conforme relatado por Seneda e colaboradores (2002).

Merton e colaboradores (2003), consideraram que a utilização de FSH anterior à aspiração folicular durante 2 semanas otimizou a produção de embriões por sessão. No entanto, a frequência de OPU afetou a qualidade e a quantidade dos oócitos coletados. A OPU quando realizada de forma descontínua (entre o início do estro e 12 dias após), permitiu que as doadoras retornassem a ciclicidade de forma natural, não afetando a função ovariana. Entretanto, a OPU contínua pode alterar o período de ovulação. Os estudos de Petyim e colaboradores (2003) demonstraram que o número de oócitos não diferiu em ambos os esquemas de aspiração, mas sugeriram que a OPU descontínua seja aplicada.

Em fêmeas submetidas à biópsia guiada por ultrassonografia transvaginal, o exame histológico demonstrou intenso infiltrado de células vermelhas no estroma ovariano (AERTS et al., 2005). Analisando animais puncionados, Demarque e colaboradores (2003), observaram através da histologia a presença de corpo lúteo e de folículos normais, indicando atividade cíclica ovariana regular. Viana e colaboradores (2003) observaram que folículos previamente aspirados apresentaram hemorragia interna e graus variados de desorganização das camadas da parede folicular. Observou-se também, a presença de áreas de tecido luteal ou de células luteais dispersas no estroma ovariano, provavelmente originadas da luteinização parcial de folículos cuja parede foi fragmentada pela punção. A luteinização de folículos puncionados, em particular, seria responsável pelas concentrações subluteais de progesterona observadas em animais puncionados intensamente (VIANA et al., 2000a).

Nos ovários submetidos a maior número de punções, o espessamento do epitélio ovariano, comprometeu a visualização externa dos folículos em crescimento, quando os ovários foram avaliados macroscopicamente (VIANA et al., 2003). Animais submetidos a até 20 sessões de punções apresentaram baixa incidência de lesões, coerente com as observações de que o procedimento não causa, necessariamente, comprometimento da atividade ovariana (GIBBONS et al., 1994). Viana e colaboradores (2002), não observaram redução na recuperação

de oócitos por vaca no decorrer do período experimental, mesmo quando foram constatadas seqüelas aos tratamentos.

## **2.3. MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR**

### **2.3.1 ASPIRAÇÃO DO FOLÍCULO DOMINANTE**

De acordo com Adams (1994), no dia posterior a remoção do folículo dominante por eletrocauterização inicia-se um pico de FSH, responsável pela emergência de uma nova onda de crescimento folicular, cerca de dois dias após a cauterização. Outra maneira de eliminar o folículo dominante, rotineiramente utilizada em programas de fertilização *in vitro*, é a aspiração por punção ovariana guiada por ultrassonografia (BERGFELT et al., 1994). Em experimento de ablação do folículo dominante, comparando um grupo de novilhas superovuladas aspiradas após um dia de remoção do folículo dominante e tratamentos com FSH mais implante com progestágeno, confirmaram que o controle do corpo lúteo apresentou resposta mais consistente, em relação ao número de embriões viáveis e transferíveis (BERGFELT et al., 1997). Em outro estudo, animais submetidos à aspiração do folículo dominante (FD) dois dias antes do início da superovulação (SPO), realizada durante o diestro, tiveram maior resposta superovulatória do que aqueles em que a SPO foi iniciada em presença de um FD (HENDRIKSEN et al., 2000).

Bacelar e colaboradores (2010), avaliando o incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos indicus*) em dois tratamentos para controle da onda de crescimento folicular, um primeiro através da ablação de todos os folículos três dias antes da aspiração folicular e outro, por controle hormonal com benzoato de estradiol e progesterona injetável, concluiu que o protocolo hormonal mostrou-se uma alternativa viável para tratamentos pré-aspiração, havendo benefícios adicionais pela ausência de corpo lúteo no momento da aspiração folicular. Além disso, estes autores concluíram que em consequência aos dois procedimentos, iniciou-se uma nova onda de crescimento folicular aproximadamente seis dias após o tratamento hormonal, e três dias após a

ablação dos folículos dominantes e subordinados aos três dias antes da aspiração folicular.

Chaubal e colaboradores (2006), em experimento de protocolos de aspiração folicular (OPU) uma ou duas vezes por semana, com uso de FSH e remoção do folículo dominante (RFD) 72 horas antes da aspiração, quase duplicaram a produção de blastocistos nos animais com RFD em relação ao grupo controle. Nos grupos estimulados, quando o FSH foi dado 36 horas após RFD, seguido por OPU 48 horas mais tarde, obtiveram maior número de folículos, de oócitos e embriões durante cada sessão semanal. O protocolo que consistiu de RFD, tratamento com FSH e uma OPU por semana, foi o mais produtivo. Além disso, a literatura também cita que somente a aspiração do folículo dominante pode controlar o crescimento folicular, promovendo a emergência de nova onda folicular após 1 a 2 dias (BERFELT et al., 1994; CAVALIERI et al., 2001). A presença do folículo dominante reduz significativamente a competência dos oócitos inclusos em folículos subordinados (HENDRIKSEN et al., 2004), além de interferir no número de folículos visualizados no momento da aspiração folicular (TORRES JUNIOR et al., 2006). Seneda e colaboradores (2001) mostraram melhor eficiência no número de oócitos recuperados a partir de folículos <5 mm de diâmetro. Por outro lado, com folículos > 5mm, espera-se encontrar maior número de folículos atrésicos, em razão da dominância folicular que ocorre nos bovinos (GINTHER, 2000).

### **2.3.2 INTERAÇÃO REPRODUÇÃO E NUTRIÇÃO**

A idade da vaca também é um fator importante que influencia a duração do anestro pós-parto. Esse efeito é bastante visível quando se compara a taxa de ciclicidade após o parto entre primíparas e multíparas. Como as vacas de primeira cria ainda estão em crescimento durante a lactação, os requerimentos nutricionais são maiores e o consumo geralmente não supre essas necessidades, principalmente no terço inicial da lactação. Dessa forma, as vacas de primeira cria apresentam balanço energético negativo mais acentuado após o parto, com maior mobilização de reservas corpóreas (perda de condição corporal (LALMAN et al.,

1997). Esse fator contribui para maior inibição na secreção pulsátil de LH prolongando o período anovulatório. Portanto, o efeito da idade da matriz no tempo de retorno à atividade cíclica ovariana está relacionado ao maior grau de deficiência energética pós-parto nos animais mais novos, de forma que o retorno à ciclicidade é mais demorado em vacas de primeira cria do que em vacas de segunda cria, que por sua vez é mais demorado do que em vacas de terceira ou mais crias.

A leptina tem papel homeorrético ao agir como indicador do tecido adiposo animal e fornecer um mecanismo de *feedback* para controlar a ingestão de alimentos, embora o sistema regulador geral seja complexo (VERNON et al., 2001). Além dos seus efeitos sobre a ingestão de alimentos, verificou-se que a leptina modula a transferência e partição de nutrientes através da interação com outros hormônios, inclusive insulina, glucagon, glicocorticóides, hormônio de crescimento, IGF-1, citocinas, e hormônios tireoidianos. Parece que tanto a insulina como o IGF-1 estão envolvidos na regulação das respostas da leptina a nutrição (ARMSTRONG et al., 2003). Mostrou-se também que outros fatores sintetizados pelo tecido adiposo (fator  $\alpha$  de necrose tumoral e resistina) interagem com a leptina na regulamentação da gordura corporal (VERNON et al., 2001).

Estima-se que aproximadamente 80% da variação na fertilidade ocorram devido a fatores ambientais, dos quais mais de 50% são explicados pela nutrição (LOTTHAMMER, 1991). Animais criados em regiões tropicais apresentam comprometimento na atividade ovariana pós-parto devido ao inadequado conteúdo energético fornecido pelas pastagens. Dessa maneira, a energia ingerida pelo animal é priorizada para funções vitais de manutenção e de produção de leite, em detrimento das funções reprodutivas (MONTIEL & AHUJA, 2005).

Adicionalmente, a literatura (MONTIEL & AHUJA, 2005) aponta o hipotálamo como a área pela qual os fatores externos (como o estatus nutricional) e internos são integrados para regular o eixo endócrino reprodutivo. Estímulos hipotalâmicos, como a severidade e duração da restrição alimentar, afetariam a resposta hipofisária e, conseqüentemente, ovariana, promovendo alterações importantes de ordem reprodutiva. Efeitos resultantes do comprometimento

nutricional são a supressão na liberação de GnRH e conseqüente diminuição na freqüência dos pulsos de LH (SCHILLO, 1992), reduzindo o diâmetro máximo do folículo dominante e a duração da onda de crescimento folicular (RHODES et al., 1995b; WILTBANK et al., 2002). De acordo com esses achados, pode-se inferir que a avaliação do *status* nutricional e da nutrição do rebanho é, de fato, importante ferramenta do manejo reprodutivo (MONTIEL & AHUJA, 2005).

Uma das mais importantes habilidades da vaca é a capacidade de utilizar suas reservas energéticas corpóreas em períodos de balanço energético negativo. Nas fêmeas, existe necessidade de adequada quantidade de reservas de energia (gordura corporal) para suprir o metabolismo basal, o crescimento, a lactação, a manutenção da saúde e, ainda, a função reprodutiva (WRIGHT et al., 1987; EDMONSON et al., 1989). Inúmeros trabalhos científicos mostram que as vacas apresentam alta demanda energética no período pós-parto. Também, sabe-se que vacas que parem magras (sem reservas corporais), e que perdem muito peso nos primeiros meses pós-parto, entram em prolongado período de anestro (CANFIELD & BUTLER, 1990b). Assim, durante o final da gestação, quantidades suficientes de energia devem ser armazenadas nos tecidos corporais, na tentativa de suprir o balanço energético negativo pós-parto.

A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com baixo desempenho reprodutivo, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite (SANTOS et al., 2004a). Por outro lado, vários estudos mostram que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de superovulação, diminuem a produção embrionária e alteram a expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está claro, mas acredita-se que esteja relacionado com a produção de oócitos com qualidade comprometida (DUNNE et al., 2000; YAAKUB et al., 1999b).

O estado nutricional das fêmeas no período pré e pós-parto é um dos principais fatores determinantes para o prolongamento do anestro pós-parto (ECHTERNKAMP et al., 1982; LALMAN et al., 1997) e muitas vezes limitante para

a adequada resposta aos tratamentos de indução de cio (BARUSELLI et al., 2004). Em vacas leiteiras de alta produção, o principal fator determinante para o prolongamento do anestro pós-parto é o balanço energético negativo (BEN), devido à excessiva perda de peso após o parto (BUTLER, 2000; 2003).

### **2.3.3 ENDOCRINOLOGIA E ANESTRO PÓS-PARTO**

Dentre os fatores envolvidos na duração do período de anestro em bovinos, destacam-se o estado nutricional pré e pós-parto, a ocorrência de balanço energético negativo (BEM), o estímulo da mamada e a alta produção de vacas leiteiras. Estes fatores influenciam o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisiário, pois atuam na regulação da liberação de GnRH e gonadotrofinas hipofisiárias (WILLIAMS et al., 1996). Os vários mecanismos que atuam na regulação do anestro pós-parto podem atuar isoladamente ou de forma conjunta, podendo haver interação entre mecanismos hormonais, sensoriais, nutricionais e comportamentais na regulação da reprodução no período puerperal (WILLIAMS et al., 1996).

Anestro é o estado de aclicidade ovariana, refletido pela completa inatividade sexual espontânea sem manifestação de estro e está associado à presença de ovários estáticos e lisos, pois, apesar do desenvolvimento folicular ocorrer, nenhum dos folículos que inicia o crescimento chega a maturar e, conseqüentemente, ovular (MORO et al., 1994). O anestro pós-parto é o período que vai do parto até a manifestação do primeiro cio fértil (YAVAS & WALTON, 2000), tendo a sua duração influenciada por diversos fatores como o estado nutricional pré e pós-parto (HOLNESS et al., 1978), a involução uterina (YAVAS & WALTON, 2000), o estímulo da mamada (LAMB et al., 1997), a produção leiteira (BARTLETT et al., 1987), o número de parições e a exposição a touros após o parto (FERNANDEZ et al., 1996; YAVAS & WALTON, 2000). Outros fatores como a presença do bezerro, idade da vaca e distocias, também influenciam a duração do anestro pós-parto (OYEDIPE et al., 1988; GALINA & ARTHUR, 1990; GALINA et al., 1982, 1994, 1995, 1996). Esses fatores, atuando negativamente,

interrompem o mecanismo endócrino que controla a manifestação de estro e subsequente ovulação (SHORT et al., 1990; YAVAS & WALTON, 2000).

No terço final da gestação as concentrações de gonadotrofinas são muito baixas devido ao efeito da retroalimentação negativa da progesterona e do estrogênio sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário. No entanto, após o parto, as concentrações de FSH aumentam drasticamente dentro de 5 dias (RHODES et al. 2003), levando ao surgimento da primeira onda folicular (revisto por WILTBANK et al., 2002). Assim, um folículo dominante começa a crescer em torno de 10 a 14 dias pós-parto (SAVIO et al., 1988; MURPHY et al., 1990). Este primeiro folículo dominante pode tornar-se totalmente maduro e ovular, ou tornar-se atrésico e ser substituído por um ou mais folículos dominantes subsequentes ou, ainda continuar a crescer e tornar-se cístico (WILTBANK et al., 2002). A ovulação de um folículo dominante ocorre somente quando a produção de estradiol pelo folículo é suficiente para promover o pico pré-ovulatório de LH na presença de baixas concentrações circulantes de progesterona. Porém, isto apenas irá ocorrer quando o estoque de LH estiver completamente restabelecido (YAVAS & WALTON, 2000). Yavas e Walton (2000) sugerem que dentro de 15 a 30 dias pós-parto os estoques de LH estão restabelecidos, e que o estado nutricional e a amamentação podem ser os fatores mais importantes na inibição da ovulação pós-parto.

O intervalo de partos ideal, para que se obtenha o máximo da eficiência reprodutiva de uma fêmea bovina é de 12 meses, no entanto, vacas de corte com cria ao pé, especialmente primíparas (YAVAS & WALTON, 2000), e vacas leiteiras com baixa condição corporal no pós-parto (BUTLER, 2003) são as categorias que apresentam maior incidência de anestro pós-parto prolongado.

O número de partições tem influência na duração do período de anestro, sendo que com o decorrer das partições durante a vida útil da vaca, a duração do anestro tende a diminuir (BELLOWS et al., 1982). O intervalo pós-parto geralmente é mais longo em vacas primíparas do que em múltíparas (YAVAS & WALTON, 2000), devido ao balanço energético negativo (BEN) ser mais pronunciado em primíparas (BELLOWS et al., 1982). Isto se deve às vacas mais jovens ainda apresentarem-se em fase de crescimento após o parto.

Vacas com alta produção de leite são mais suscetíveis ao desenvolvimento do anestro prolongado (BARTLETT et al., 1987). A seleção de vacas para alta produção leiteira tem sido acompanhada por um decréscimo na eficiência reprodutiva (BAGNATO et al., 1994) e nas concentrações sanguíneas de insulina no pós-parto recente (BONCZEK et al., 1988; SNIJDERS et al., 1998). Este mediador metabólico tem um efeito estimulador na esteroidogênese ovariana (PORETSKY et al., 1999) e falhas na ovulação da primeira onda folicular estão associadas a baixos níveis de insulina (BEAM & BUTLER, 1997). Outro aspecto relevante em vacas de alta produção leiteira, diz respeito a disfunções ovarianas, tais como o prolongamento da fase luteal, que também podem prolongar o anestro pós-parto (SHRESTHA et al., 2004).

O tempo necessário para que ocorra a involução uterina pós-parto tem relação com a duração do período de anestro, sendo influenciada principalmente pela condição puerperal (EL et al., 1995). Fêmeas sem complicações puerperais têm um período de inatividade ovariana pós-parto menor do que aquelas com anormalidades puerperais, como distocia, retenção de placenta, infecção uterina, cetose e hipocalcemia puerperal (EL et al., 1995).

Estudos indicam que a exposição de fêmeas à presença de touros após o parto diminui a duração do período de anestro, por estimular o reinício da atividade ovariana (FERNANDEZ et al., 1996; LANDAETA-HERNÁNDEZ et al., 2004). O “efeito touro” atua aumentando a sensibilidade do hipotálamo ao *feedback* positivo do estrogênio induzindo a liberação de LH da hipófise. Porém, o mecanismo que leva a este aumento, ainda não está bem esclarecido, sendo em parte devido à liberação de ferormônios (REKWOT et al., 2000). Outra possibilidade é que o estímulo do touro atue diretamente sobre os ovários, aumentando o número de receptores foliculares ao LH (CUSTER et al., 1990).

Vacas expostas ao touro constantemente logo após o parto, ou com 30 dias pós-parto, apresentam um menor intervalo do parto a primeira manifestação de cio. Já em vacas expostas intermitentemente ou isoladas da presença de touros, este intervalo é maior (FERNANDEZ et al., 1996).

Mesmo após o restabelecimento do estoque de LH na hipófise anterior, o vínculo entre a mãe e o bezerro pode afetar a duração do anestro pós-parto, uma vez que reduz a liberação de GnRH e a secreção de LH (WILLIAMS, 1990). Essas alterações fisiológicas podem afetar a maturação final do folículo dominante e a ovulação. Além disso, durante o ato de amamentar, a estimulação dos órgãos do sentido maternos como o olfato, a visão, a audição e o estímulo tátil pode, também, induzir a ocorrência dessas alterações fisiológicas em vacas de corte no pós-parto (WILLIAMS et al., 1996).

O estímulo da mamada aumenta o período de anestro e sua remoção restabelece a atividade ovariana pós-parto, por eliminação de seu efeito supressivo na liberação de gonadotrofinas hipofisárias (RUND et al., 1989; ZALESKY et al., 1990). Dessa forma, o intervalo do parto a primeira ovulação é menor em vacas em que o bezerro é desmamado ou é impedido seu contato com o úbere da fêmea após 13 dias do parto (LAMB et al., 1997).

O efeito supressivo da mamada na ovulação pós-parto é mediado pelo estímulo tátil na área inguinal da vaca, enquanto estimulada por sua própria cria (STEVENSON et al., 1994; VIKER et al., 1993), ou mesmo, uma outra cria após estabelecimento de uma nova relação materna (LAMB et al., 1997). Esta inibição na liberação pulsátil de LH é modulada por estrogênios ovarianos, ou seja, a mamada aumenta a sensibilidade do hipotálamo para o *feedback* negativo do estrogênio, resultando na supressão dos pulsos de LH (ACOSTA et al., 1983; RUND et al., 1989; SCHALLENBERGER & PETERSON, 1982; ZALESKY et al., 1990). Entre os dias 10 e 30 pós-parto, ocorre aumento na produção e liberação de LH na hipófise (MOSS et al., 1985). Portanto, a mamada do bezerro tem influência na secreção de LH, sendo que vacas amamentando têm menor secreção deste hormônio, quando comparadas com vacas que não estão amamentando (CARRUTHERS et al., 1980; RANDEL et al., 1989).

O mecanismo envolvido na supressão da liberação de LH em função da presença do bezerro se dá através da ação dos opióides endógenos durante o período de anestro pós-parto (MYERS et al., 1989; WHISNANT et al., 1986), sendo que a remoção do terneiro resulta na interrupção da inibição do opióide na

secreção de LH. A concentração de  $\beta$ -endorfina (opióide) no hipotálamo é negativamente correlacionada com a concentração de GnRH (MALVEN et al., 1986). Além disso, a concentração de RNAm para pró-opiomelanocortina (precursor da  $\beta$ -endorfina) no hipotálamo é maior em vacas amamentando, do que em vacas não amamentando, e a sua concentração é negativamente correlacionada com a concentração de LH (BYERLEY et al., 1993). Sendo assim, os opióides têm influência no retorno à atividade ovariana pós-parto, inibindo a produção de GnRH no hipotálamo, e indiretamente, suprimindo a liberação de LH pela hipófise. A restrição da mamada em duas vezes ao dia não é suficiente para diminuir a duração do anestro, suprimindo a atividade ovariana tanto quanto a mamada permanente.

O BEN durante as primeiras 3-4 semanas após o parto é altamente correlacionado com o intervalo para a ocorrência da primeira ovulação (BUTLER, 2003). Existem várias evidências de que os hormônios metabólicos, como o hormônio do crescimento (GH), insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) (ROBERTS et al., 1997) e a leptina (SPICER et al., 1997; BARB, 1999; DELAUAUD et al., 2002; SPICER et al., 2002a) são importantes mediadores dos efeitos do balanço energético no desenvolvimento folicular ovariano de bovinos. Os hormônios IGF-I e insulina têm importante função no crescimento folicular, estimulando a mitogênese e esteroidogênese das células tecais, mediante indução do LH (SPICER et al., 1995). Ainda, com relação a esses fatores, e colaboradores (2002b), observaram que existe relação entre os níveis de IGF-I e a condição corporal de vacas de corte, mas não encontrou relação entre esta e o tempo para aparecimento do primeiro folículo dominante no pós-parto.

Quando a taxa de aumento da produção de leite excede a quantidade de nutrientes ingerida devido ao consumo subótimo de matéria seca (MS), ocorre deficiência na ingestão de energia líquida (EL) em relação a sua utilização para manutenção e produção de leite, que resulta no BEN. O BEN está relacionado ( $r = 0,80$ ) com a produção de leite, e freqüentemente, é máximo durante as duas ou três primeiras semanas de lactação, acarretando em mobilização de reservas e

perdas do peso corporal que podem persistir por 10 a 12 semanas de lactação (BUTLER & SMITH, 1989).

Butler e colaboradores (1981b), verificaram que o ponto mínimo da curva do BEN ocorreu aos 15 dias do pós-parto enquanto a primeira ovulação foi observada, em média, no 29º dia pós-parto. A média, de 14 dias, entre o ponto mínimo da curva do BEN e a primeira ovulação do pós-parto também foi verificada por Canfield e colaboradores (1990b). Já Senatore e colaboradores (1996), trabalhando com primíparas, observaram que o intervalo do parto à primeira ovulação no pós-parto foi, em média, 30 dias, correspondendo à 12 dias após o ponto mínimo da curva do BEN. Em ambos os estudos, a primeira ovulação do pós-parto ocorreu quando as vacas apresentavam-se em BEN, mas sempre após o ponto mínimo de sua curva, quando os animais já estavam em recuperação, tendendo ao balanço energético de equilíbrio. Quando o balanço energético tende ao equilíbrio, com o aumento do consumo de matéria seca, ocorre o primeiro sinal metabólico que resulta num aumento dos pulsos de hormônio luteinizante (LH) e também no aumento da disponibilidade de insulina, habilitando os folículos ovarianos a responderem aos estímulos gonadotrópicos. Spicer e colaboradores (1993), concluíram que a insulina é um dos principais hormônio metabólico estimulador do desenvolvimento das células foliculares e também que o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), cujas concentrações foram reduzidas em vacas submetidas à restrição de energia na dieta (BURNES et al., 1997), regula a proliferação e a diferenciação das células da granulosa de folículos em desenvolvimento. Butler (2000), verificou que os efeitos do BEN resultaram no atraso da primeira ovulação do pós-parto por meio da inibição da frequência pulsátil do LH e também redução dos níveis de glicose, insulina e IGF-I, que coletivamente controlam a produção de estrógeno pelos folículos dominantes. Além disso, foram observadas menores concentrações séricas de progesterona durante o período de BEN evidenciando uma redução da fertilidade.

Roche e colaboradores (2000), observaram que o BEN, em vacas leiteiras de alta produção, reduz a frequência dos pulsos de LH, a taxa de crescimento dos folículos, o diâmetro do folículo dominante, as concentrações de glicose e insulina

e ainda, aumentou a concentração de somatotropina (GH) e de outros metabólicos sanguíneos. Tais efeitos ocasionaram aumento das perdas de peso corporal, redução do ECC e elevação do percentual de vacas em anestro.

A leptina é um hormônio protéico primariamente secretado pelo adipócito e tem sido reportado como um dos sinais que regulam várias funções fisiológicas, entre elas a homeostase energética e reprodutiva (FRUHBECK, 2001). As concentrações circulantes de leptina são elevadas durante a gestação, diminuem antes do parto e são restauradas gradualmente ao normal em torno da época da primeira ovulação (WATHES, 2007). A leptina pode modular o eixo central reprodutivo no cérebro e a resposta as concentrações dos hormônios ovarianos (CUNNINGHAM et al., 1999) e também é responsiva a eliminação do déficit da energia no início da lactação (BLOCK et al., 2001). Suas concentrações são relacionadas com as concentrações de glicose, AGNE, insulina, GH e da entrada de alimento (BLOCK et al., 2001).

A suplementação de energia no período pós-parto leva a um retorno mais precoce a ciclicidade (BELLOWS & SHORT, 1978; HOLNESS et al., 1978; ROBERTS et al., 1997; STAGG et al., 1995). Embora não haja diferença no período para a detecção da emergência da primeira onda folicular pós-parto entre vacas com altos e baixos níveis de energia na dieta, vacas recebendo baixos níveis de energia possuem maior número de ondas foliculares antes da primeira ovulação. Isto se deve provavelmente às concentrações insuficientes de LH para estimular a maturação final do folículo pré-ovulatório (STAGG et al., 1995).

## **2.4 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL (ECC)**

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução, a nutrição tem um papel importante por afetar diretamente aspectos da fisiologia e desempenho reprodutivo na fêmea bovina. Na literatura, vários estudos associaram a nutrição à redução da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causas determinantes o balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela diminuição do escore da condição corporal no pós-parto (MOREIRA et al., 2000; LOPEZ-GATIUS et al., 2002), e pela própria condição corporal ao parto

(FERREIRA & TORRES 1993; FERREIRA et al., 2005b). No início da lactação, a habilidade da vaca em mobilizar reservas corporais contribui para o seu potencial de produção de leite. Todavia, a mobilização de reservas associada ao consumo subótimo de matéria seca acarreta perdas de peso corporal, as quais refletem diretamente na fertilidade do período pós-parto. O conhecimento da taxa de perda de peso que o animal é capaz de suportar, sem prejudicar a atividade ovariana pós-parto, é importante para a estruturação do manejo nutricional nos períodos pré e pós-parto. As reservas corporais adquiridas no período pré-parto, com melhor eficiência e alimentos de menor custo, poderão ser mobilizadas e utilizadas para a produção de leite no início da lactação. Para Randel (1990), peso e condição corporal ao parto são indicadores funcionais da subsequente função reprodutiva, uma vez que, nutrição protéica e/ou energética inadequada no pré ou no pós-parto reduz a taxa de concepção ao primeiro serviço, ocasionando aumento do período de serviço e, conseqüentemente, prolongamento do intervalo de partos (IP).

O ECC é uma estimativa subjetiva das reservas energéticas metabolizáveis do tecido adiposo. Baseia-se na avaliação da aparência exterior do animal com relação às suas reservas de gordura corporal, as quais são diretamente influenciadas pelo seu balanço energético. Para vacas de corte, é comumente utilizada uma escala de nove pontos (WAGNER et al., 1988). No entanto, as escalas de cinco pontos (MARLOWE et al., 1962) e de cinco a 15 pontos (SPELBRING et al., 1977) também têm sido descritas.

O ECC é fundamentado na observação visual e na palpação de áreas específicas, com propósito de avaliar, subjetivamente, depósitos subcutâneos de tecido adiposo e massa muscular (SANTOS & AMSTALDEN, 1998), podendo ocorrer diferença entre raças em função da conformação anatômica dos animais. A escala de escore de condição corporal de 1 a 5, desenvolvida por WILDMAN et al. (1982), é utilizada com maior freqüência nos rebanhos leiteiros, enquanto nos de corte, as vacas são pontuadas em escala de 1 a 9 (RICHARD et al., 1986). Nas raças de corte de origem européia, a mudança de uma unidade da condição

corporal na escala de 1 a 9, corresponde a 30 a 40 kg de mudança no peso corporal (SANTOS & AMSTALDEN, 1998).

Diversos autores recomendam o acompanhamento do ECC, uma vez que ele se mostra como um reflexo da condição nutricional (SHORT et al., 1990; ARREGUIN et al., 1997) em vacas de corte (RAE et al., 1996) e leite (WILDMAN et al., 1982; EDMONSON et al., 1989). Em vacas de leite, esta técnica tem sido recomendada como método para elucidar a evolução do manejo nutricional (GILLUND et al., 2001).

O ECC é determinado por avaliações visuais e ou táteis de locais definidos do corpo, sendo que elas podem variar tanto nos pontos a serem examinados, como no número de locais a serem observados e avaliados (WILDMAN et al., 1982; WAGNER et al., 1988; EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990; FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994; LASSEN et al., 2003; ROCHE et al., 2004). A subjetividade, repetibilidade e validade do ECC foram investigadas em vários estudos, validando o uso desta ferramenta no manejo reprodutivo e nutricional do indivíduo e do rebanho (EDMONSON et al., 1989; FERGUSON et al., 1994; DOMEcq et al., 1995).

Domecq e colaboradores (1995), validaram o ECC com medições de gordura subcutânea com o uso da ultrassonografia, abordando a região lombar, a garupa e a inserção da calda. Os níveis de ECC foram significativamente associados às medições ultrassonográficas, e os coeficientes de determinação para os modelos variaram de 0,36 a 0,65, dependendo do local de mensuração. Os autores concluíram que o ECC é tão válido quanto às mensurações por ultrassonografia para quantificar a quantidade de gordura subcutânea (EGS), em vacas leiteiras.

Em vacas Nelore, Ayres e colaboradores (2007), avaliaram o uso do ECC (escala de 1 a 5) e do score da gordura subcutânea (EGS), como preditores de presença de corpo lúteo (CL) no pós-parto precoce ( $41,9 \pm 7,1$  dias). Os autores verificaram que tanto os animais com boa condição corporal ( $ECC > 3,0$ ), quanto aos com boa quantidade de reserva de energia armazenada na forma de gordura ( $EGS > 0,6\text{mm}$ ), apresentam maior ciclicidade confirmada pela presença de corpo

lúteo, confirmando a importância da reserva de energia (na forma de gordura) na fertilidade de vacas no período pós-parto. Além disso, em estudo posterior, Ayres (2008), verificou que o ECC apresenta forte relação ( $R^2 = 0,84$ ) e, ainda, uma altíssima correlação ( $r=0,90$ ;  $P<0,0001$ ) com o EGS. Assim, a aferição do ECC pode ser utilizada como uma ótima ferramenta para se estimar a espessura de gordura subcutânea em vacas Nelore, com alta precisão e facilidade, uma vez que não demanda equipamentos específicos ou contenção do animal.

É importante ressaltar que a condição corporal pós-parto é reflexo do estado nutricional pré-parto, sendo que a função reprodutiva é mais afetada pelos níveis de energia antes do parto do que depois deste (PERRY et al., 1991). Porém, vacas que sofreram restrição energética no pré-parto, mas que no momento do parto apresentaram ECC moderado (5 a 6, numa escala de 1 a 9), não tiveram sua performance reprodutiva pós-parto afetada (MORRISON et al., 1999). Além disso, uma dieta rica em energia no pós-parto diminui, mas não elimina totalmente o efeito negativo de uma dieta pré-parto deficiente (PERRY et al., 1991).

Em vacas de leite, podemos verificar a existência de uma condição corporal ideal para cada fase da lactação e esta é uma ferramenta que otimiza a produção de leite, minimiza os problemas reprodutivos e maximiza retorno econômico (GEARHART et al., 1990). Por outro lado, o baixo ECC ao parto também reduz taxas de prenhez ao primeiro serviço (ECC < 2.5) e aumenta os dias em aberto ( $BCS \leq 3,5$ ; LOPEZ-GATIUS et al., 2003). Uma maior perda da condição corporal no início da lactação também está relacionada com pior capacidade reprodutiva (PRYCE et al., 2001).

Em gado de corte, estudos demonstraram que a nutrição pré-parto refletida pelo ECC ao parto é o maior determinante da duração do anestro pós-parto (DUNN & KALTENBACH, 1980; DZIUK & BELLOWS, 1983; RICHARDS et al., 1986; SELK et al., 1988). Prova disso é a existência de uma correlação negativa entre ECC ao parto e duração do anestro pós-parto (RICHARDS et al., 1986; WRIGHT et al., 1987, 1992). Além disso, quando primíparas de corte já estão em BEN pré-parto, a variação do ECC no parto é o mais importante fator

determinando a duração do período de anestro (LALMAN et al., 1997). Em experimento realizado por Lalman e colaboradores (1997), vacas primíparas foram submetidas a dietas com restrição de nutrientes no pré-parto, parindo com ECC médio de 4 (escala de 1 a 9). Como consequência, apresentaram um período de anestro pós-parto de  $121 \pm 6$  dias, concordando com resultados de outros estudos prévios (DEJARNETTE et al., 2001; RICHARDS et al., 1986; SPITZER et al., 1995), que indicam que vacas parindo em baixas condições corporais têm o período parto a primeira ovulação prolongado.

Gearhart e colaboradores (1990), verificaram que vacas supercondicionadas ( $ECC \geq 4$  em escala de 1 a 5), apresentaram maior incidência de cistos ovarianos e metrites no pós-parto. Estes autores também observaram que o supercondicionamento (Síndrome da Vaca Gorda) foi associado a um complexo de problemas digestivos, metabólicos e sistêmicos ao parto e durante a lactação. Fergusson (1991), verificou que as taxas de concepção de vacas que perderam 1,0 de ECC foram significativamente menores que vacas que mantiveram ou ganharam ECC. Ruegg & Milton (1995), verificaram que a duração e a intensidade da perda de condição corporal no pós-parto dependeram primariamente do ECC ao parto e foram mais acentuadas em vacas com escores elevados.

A atividade ovariana pós-parto nas vacas leiteiras é diretamente dependente da disponibilidade dos nutrientes em relação a sua utilização para manutenção e lactação. O retorno dos ciclos estrais ovarianos ocorre durante as primeiras semanas de lactação com a primeira ovulação, em média, 15 a 42 dias do pós-parto (BUTLER & SMITH, 1989) podendo este intervalo ser prolongado em vacas de alta produção e ou em animais com dietas desbalanceadas.

Wiltbank e colaboradores (1962), verificaram que a perda de 10% a 15% de peso corporal no pós-parto, não influenciou o reinício da atividade ovariana em animais com boa condição corporal ao parto. Villa-Godoy e colaboradores (1988), relataram que vacas de boa condição corporal ao parto atrasam o reinício da atividade ovariana quando a perda de peso nos dois primeiros meses de lactação é superior a 15%. Ruas e colaboradores (2000), verificaram que a condição

corporal ao parto tem maior influência na duração do anestro pós-parto do que a alimentação no pós-parto.

Ferreira & Torres (1993), observaram que a percentagem de perda de peso para cessar a atividade ovariana luteal cíclica não depende do peso vivo inicial e sim do ECC. Neste trabalho, a alta correlação entre percentagem de perda de peso e escore final ( $r = 0,95$ ) mostrou que para animais de condição corporal inferior, uma menor percentagem de perda de peso é capaz de cessar a atividade ovariana.

#### **2.4.1 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL E QUALIDADE DE OÓCITOS**

Os testes utilizando escores de condição corporal dos animais (ECC) e concentrações sanguíneas de colesterol e triglicérides anteriores à aspiração do oócito, podem ser indicadores de lipídios intracelulares em oócitos e embriões. Recentemente, Ballard e colaboradores (2008), demonstraram que a retirada de sangue de doadoras *Bos indicus* em grupos com ECC elevado mostraram que concentrações circulantes elevadas de triglicérides e colesterol, estão correlacionados com o elevado teor de lipídios de oócitos (BALLARD et al., 2008).

Tem sido demonstrado que concentrações circulantes de colesterol e triglicérides são indicadores, que podem ser associados a coloração de embriões bovinos (LEROY et al., 2004). Tem sido relatado que bovinos com alto colesterol e baixos triglicérides circulantes, produzem embriões significativamente mais escuros comparados com doadoras que tiveram baixas concentrações circulantes de colesterol e embriões com densidade lipídica menor (LEROY et al., 2005). Estas observações, no entanto, são altamente subjetivas entre os observadores. Doadoras com elevadas concentrações circulantes de colesterol no momento da aspiração folicular e produção dos embriões, têm baixas taxas de prenhez após a transferência de mórulas em vacas sincronizadas (HILL et al., 1988).

#### **2.4.2 DIETA E QUALIDADE DE OÓCITOS**

A ingestão de nutrientes age em vários níveis dentro do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que

controlam direta ou indiretamente a função ovariana e a produção embrionária. O ciclo estral é controlado basicamente pelo GnRH, que é excretado no sistema porta hipofisário de forma pulsátil, e regulados por *feedback* do estradiol e progesterona (CLARKE & POMPOLO, 2005). A nutrição também influencia o desenvolvimento folicular (WEBB et al., 2004), com mudanças de curto prazo no plano de nutrição afetando o recrutamento de pequenos folículos antrais (1 a 4 mm), sem afetar as concentrações circulantes de FSH (GUTIERREZ et al., 1997; GONG et al., 2002a), resultando em número maior de ovulações após desafio superovulatório com gonadotropina (GONG et al., 2002b). O aumento da energia alimentar diminui as concentrações de estado constante de mRNA que codificam IGFBP-2 e IGFBP-4 em pequenos folículos antrais, que, por sua vez, aumentam a disponibilidade de IGF-II produzida localmente e IGF-I sistemicamente derivada nesses folículos (ARMSTRONG et al., 2003; WEBB et al., 2004).

Em espécies mono ovulatórias, como as vacas de alta produção leiteira, o status metabólico dos animais, por exemplo, balanço energético negativo no pós-parto, afeta uma variedade de hormônios circulantes e de fatores de crescimento como GH, IGF-I, insulina, leptina, cortisol e tiroxina (WEBB et al., 2004). Existe um aumento nas evidências que associam a diminuição da fertilidade das vacas de leite ao balanço energético negativo pós-parto e a reduzidas concentrações de IGF-I e de insulina (BEAM & BUTLER, 1999; BUTLER, 2000). O início da primeira ovulação pós-parto é atrasado em vacas de leite selecionadas por alto mérito genético em relação ao rendimento na produção de leite e isto tem também mostrado estar associado com uma menor concentração de insulina (BUTLER, 2000).

A energia é o fator que mais interfere na reprodução de fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com baixo desempenho reprodutivo, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite (SANTOS, 2005). Por outro lado, em vários estudos é demonstrado que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de superovulação, diminuem a produção embrionária e alteram a

expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está claro, mas acredita-se que esteja relacionado com a produção de ovócitos com qualidade comprometida (DUNNE et al., 1999; YAAKUB et al., 1999b).

Em vacas leiteiras, a correlação entre produção de leite e ingestão de matéria seca (MS) é alta e positiva, 0,88 (HARRISON et al., 1990). Dentre os mecanismos responsáveis pelo efeito da alimentação sobre a função ovariana e qualidade embrionária dos bovinos, o elevado consumo de energia ou ingestão de MS se destaca. O aumento da ingestão de MS causa aumento do fluxo sanguíneo para o fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002) onde há grande metabolização dos hormônios esteróides, progesterona (P4) e estradiol (E2) (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). Conseqüentemente, quanto maior a ingestão de MS, menores concentrações sanguíneas circulantes desses hormônios são observadas. De fato, Nolan e colaboradores (1998) e Santos (2005) observaram maior concentração sérica de P4 em novilhas ou vacas com alimentação restrita comparadas às com maior ingestão. Da mesma forma, Martins e colaboradores (2007), observaram maiores concentrações séricas de E2 em vacas Zebuínas não lactantes submetidas à restrição alimentar quando comparadas àquelas que receberam alta ingestão. Alterações nas concentrações sanguíneas de P4 e E2 podem afetar padrões de desenvolvimento folicular (SIROIS & FORTUNE, 1988; KNOPF et al., 1989) e a viabilidade de ovócitos e embriões (KING et al., 1994; MANN et al., 1998). Baixas concentrações séricas de P4 permitem aumento na frequência de pulsos de LH (ROBERSON et al., 1989; ADAMS et al., 1992), podendo causar maturação prematura dos ovócitos (REVAH & BUTLER, 1996), queda na qualidade ovocitária no momento da ovulação e conseqüente qualidade embrionária inferior após a fecundação (AHMAD et al., 1995).

A resposta superovulatória de uma doadora de embriões sofre grande influência do estado ovariano, o qual é influenciado por diversos fatores, dentre eles a nutrição (BASTOS et al., 2007a). Vale ressaltar que o tipo e/ou quantidade da dieta fornecida aos animais antes de iniciar os programas de superestimulação

tem forte influência sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária (YAAKUB et al., 1999a). Independente do efeito da quantidade da dieta ingerida sobre a resposta superovulatória parece ser consenso que o excesso nutricional tem efeito deletério na qualidade dos embriões produzidos (NOLAN et al., 1998; YAAKUB et al., 1999b; LOZANO et al., 2003). Bastos e colaboradores (2007b), não encontraram diferença no número de folículos recrutados e ovulados entre vacas de corte mestiças com elevado ECC alimentadas com dieta de manutenção em relação às com alta ingestão alimentar, iniciada sete dias antes do início do protocolo de superovulação. Entretanto, neste estudo foi detectado um maior número de estruturas totais e embriões viáveis coletados nos animais do grupo de manutenção. Trabalhando com novilhas de corte taurinas, Nolan e colaboradores (1998), detectaram número maior de folículos superestimulados, após aplicação de FSH, nos animais com baixa ingestão alimentar em relação aos de alta ingestão. Apesar disso, não observaram diferença entre os grupos no número de corpos lúteos e de embriões coletados ou transferíveis. Neste mesmo estudo, foi encontrado que após 24 horas de cultivo *in vitro*, uma maior proporção de embriões atingiu o estágio de blastocisto. Além disso, o número de células presentes nestes blastocistos foi superior nas novilhas que estavam sob restrição alimentar. Similarmente, Mollo e colaboradores (2007), observaram que novilhas da raça Nelore confinadas e submetidas à restrição alimentar apresentaram respostas superestimulatórias maiores do que novilhas submetidas à alta ingestão alimentar (*ad libitum*). Além disso, o número de embriões coletados também foi superior no grupo de baixa ingestão. Segundo Siddiqui e colaboradores (2002), um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5) em vacas Zebus antes de um tratamento de superovulação, seria melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, Adamiak e colaboradores (2005), acreditam que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Entretanto, Bastos e colaboradores (2007a), não encontraram diferença na resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária em novilhas da raça Nelore com ECC alto ou baixo, submetidas ou não, ao *flushing* nutricional por 14 dias, antes da superovulação.

Dietas altamente energéticas elevam a produção de glicose nos animais podendo alterar a sobrevivência embrionária. Altas concentrações de glicose no meio de cultivo comprometem o desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI & FIRST, 1992). Além da glicose, outros metabólitos e fatores de crescimento, tais como IGF-I e insulina, podem estar envolvidos no processo (ARMSTRONG et al., 2001; WEBB et al., 2004). De fato, a maioria dos trabalhos nos quais foram avaliados os efeitos da ingestão alimentar alta na produção *in vitro* de embriões foi detectado efeito negativo na viabilidade de ovócitos e/ou embriões.

Freret e colaboradores (2006), por sua vez, não observaram efeitos prejudiciais do alto ganho de peso em novilhas holandesas, na produção de embriões *in vitro* comparado a novilhas com baixo ganho de peso. Deve-se destacar entretanto, que neste estudo ambos os grupos estavam com balanço energético positivo. Ainda, no estudo de Adamiak e colaboradores (2005), foi sugerido que o *flushing* nutricional associado ao ECC elevado nos animais possa exercer efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido à hiperinsulinemia observada nesse grupo de novilhas.

Martins e colaboradores (2006), avaliaram a influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões em vacas azebuadas. Os autores observaram um maior número de folículos >3 mm de diâmetro, presentes nos ovários das vacas com alta ingestão no momento das aspirações foliculares, mas o número de ovócitos aspirados e embriões produzidos *in vitro*, não diferiu entre os grupos.

## **2.5 SENESCÊNCIA**

A proliferação celular em um animal superior não é governada apenas pelo ambiente celular, mas também depende, a longo prazo da história da célula. Está relacionada com a diferenciação celular em cada estágio de desenvolvimento, obedecendo a regras e as pequenas diferenças no controle interno de sua maquinaria celular. Os fibroblastos retirados de um feto normal humano sofrem cerca de 50 duplicações quando cultivados em um meio de cultivo padrão, e no

final deste período, a proliferação diminui e finalmente pára. Células semelhantes retiradas de um indivíduo de 40 anos de idade param de se dividir após 40 duplicações, aproximadamente, enquanto que células de uma pessoa de 80 anos cessam após 30 duplicações. Este fenômeno é denominado senescência celular devido a sua relação com a idade do organismo e pelo fato de ser observado *in vitro*. Hayflick (1998), postulou que todo tipo de célula normal tem um potencial intrínseco limitado de proliferação. Quanto ao aspecto morfológico, os fibroblastos senescentes em cultura, são maiores, achatados o que é acompanhado pela deficiência das células em replicar seu DNA em resposta aos estímulos de crescimento normais. Investigações recentes, comparando a expressão de genes, em células jovens e senescentes, mostram que a expressão de alguns genes, tais como os das histonas, é superior em células mais velhas.

A senescência *in vitro* esta diretamente relacionada com o envelhecimento *in vivo*, pois foi comprovada uma relação inversa entre idade do doador e o potencial proliferativo do fibroblasto. Embora a senescência ocorra de uma maneira previsível para uma dada população de células, ela não esta rigorosamente programada ao nível de células individuais. Em um clone de fibroblastos, aparentemente idênticos e submetidos ao cultivo padrão, algumas células se dividem muitas vezes, enquanto outras somente algumas vezes (NEVES & MARQUES, 2008). A senescência envolve perdas progressivas e irreversíveis das funções celulares, o que aumenta a probabilidade de morte (BETTS & KING, 2001). Estas mudanças podem ser graduais (como em humanos), ou repentinas e dramáticas, como no salmão que morre logo após a desova (NEVES & MARQUES, 2008).

Analisando-se essas teorias comparativamente e o organismo como um complexo de sistemas integrados, pode-se dizer que todos os sistemas orgânicos envelhecem, diferindo apenas nas taxas e no tempo em que a senescência ocorre. O envelhecimento pode ser interpretado como um processo que ocorre de forma generalizada no organismo, que se caracteriza pela somatória dos eventos de senescência que ocorrem em toda a sua dimensão (BETTS & KING, 2001). Como características básicas do processo de senescência pode-se dizer que é

deletério, progressivo (atuando em cadeia e compartilhado), intrínseco e universal. Com relação a ser intrínseco à célula, pode-se considerar que o micro ambiente ao qual a célula está submetida, ou com o qual está interagindo, também interfere significativamente no seu comportamento em termos de envelhecimento. Fica assim demonstrado que a senescência causa danos à célula que levam à morte das mesmas, sendo isto então, relacionado com a longevidade do indivíduo (BETTS & KING, 2001).

### **2.5.1 SENESCÊNCIA REPRODUTIVA**

O termo senescência refere-se ao processo progressivo e irreversível de envelhecimento, e às disfunções relacionadas à senilidade. A senescência reprodutiva, tanto em machos como em fêmeas, varia individualmente e inclui todos os aspectos do declínio reprodutivo decorrentes da idade (ADAMS, 1984; WAGNER et al., 1991). De acordo com Odell (1995), durante o processo do envelhecimento, os órgãos e tecidos do organismo sofrem modificações morfológicas e funcionais e podem se atrofiar ou ter sua eficiência fisiológica diminuída. O envelhecimento reprodutivo manifesta-se de maneira distinta no macho e na fêmea. No macho, está ligado à perda gradual das funções testiculares, já na fêmea, ocorre exaustão completa das células germinativas, perda completa da fertilidade ou diminuição abrupta na circulação dos esteróides gonadais (ADAMS, 1984; PACKER et al., 1998; BROEKMANS et al., 2007). O período pós reprodutivo nas fêmeas, caracterizado pelo tempo entre a última ovulação e a morte, é documentado em humanos, animais selvagens e de laboratório, e representa mais de 25% da vida total do indivíduo (ADAMS, 1984; PIRKE & DOERR, 1973; WAGNER et al., 1991).

Durante a vida embrionária da fêmea, as células germinativas proliferam-se, originando milhões de oócitos. Ao nascimento, ocorre redução drástica do número dos oócitos e quando a fêmea alcança a puberdade, os ovários possuem menos de 20% dos folículos primordiais presentes ao nascimento. A perda folicular é atribuída a fatores que levam à degeneração dos folículos (MEYERS et al., 1984; PACKER et al., 1998). Durante a vida reprodutiva, o decréscimo

exponencial dos oócitos ocorre devido ao processo de recrutamento e atresia folicular presente em cada ciclo estral (WAGNER et al., 1991; PACKER et al., 1998; ESHERE, 2005).

Nos animais domésticos, o declínio da fertilidade é caracterizado por diminuição da taxa de prenhez e do número de filhotes por parto, aparecimento de ciclos longos intercalados com ciclos normais, aumento da ocorrência de mortalidade embrionária, abortos, natimortos, perdas pós-parto decorrentes de má qualidade dos gametas e maior dificuldade uterina em sustentar gestações (PIRK & DOERR, 1973; HEMSELL et al., 1974; HAFEZ, 1995). Em estudo desenvolvido (KRETZER et al. 1995), com cadelas com idades entre 9 e 17 anos, foram observadas patologias uterinas, como hiperplasia endometrial, atrofia e neoplasias uterinas e mamárias em 66% dos animais. Segundo vários autores (NICHOLS et al. 2005; ESHRE, 2005; BROEKMANS, 2007), a senescência reprodutiva em humanos também é marcada pela queda abrupta nas taxas de prenhez, atribuída à redução do número de oócitos disponíveis, bem como à perda de qualidade dessas células. O declínio na fertilidade é particularmente relevante em mulheres acima de 40 anos, uma vez que essas estão associadas a complicações no decorrer da gestação, partos prematuros, más formações congênitas e maiores chances de intervenção no momento do parto (ESHRE, 2005; BROEKMANS et al., 2007) A maior parte dos estudos sobre senescência reprodutiva humana é realizada em humanos ou em roedores, porém pesquisas com fêmeas do macaco rhesus (*Macaca mulatta*), mostram que esta espécie pode ser utilizada como modelo experimental para humanos, por apresentar depleção folicular semelhante à observada na mulher. As concentrações circulantes de hormônio anti-mülleriano podem ser um indicador mais preciso da idade reprodutiva e da reserva de folículos ovarianos primordiais, em animais assim como em humanos (KEVENAAR et al, 2006; LA MARCA & VOLPE, 2006). Um declínio na contagem de folículos antrais (SCHEFFER et al, 1999), uma resposta ovariana superovulatório reduzida, e menor recuperação de ovulos e conseqüente produção embrionária, tem sido observada em mulheres mais velhas (KIM, 1995; DEW et al, 1998). Da mesma forma, as vacas mais velhas tendem a ter menos

folículos  $\geq 9$  milímetros, após superestimulação ovariana (MALHI et al., 2006). Além disso, Malhi (2005), verificou que mudanças no perfil hormonal e tamanho folicular de fêmeas bovinas idosas foram consistentes às relatadas em mulheres na transição para a menopausa, o que validou a utilização do modelo bovino para estudos referentes à senescência reprodutiva da mulher.

É bem estabelecido que a população de oócitos é fixada durante a fase embrionária e as fêmeas já nascem com um estoque não renovável e, portanto, finito, de folículos (TALBERT, 1977). Com o decorrer da vida reprodutiva, uma parcela destes folículos será recrutada para crescer, desenvolver, diferenciar e ovular. A maioria dos folículos nunca sofrerá este processo de desenvolvimento e conseqüentemente sofrerão atresia (WISE et al., 1997). A viabilidade dos oócitos maduros produzidos durante a fase de maior declínio da fertilidade foi estabelecida em experimentos de transferência de oócitos entre camundongos (TALBERT & KHRON, 1977). O envelhecimento dos oócitos pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, no atraso de sua liberação na ovulação e na demora da penetração pelo espermatozóide (ADAMS, 1984). A causa para a deterioração dos oócitos devido à idade tem sido alvo de debates científicos, apesar do consenso sobre o principal mecanismo envolvido, que é o problema de não disjunção meiótica e o acúmulo de danos no DNA com o avançar da idade (NIKOLAOU & TEMPLETON, 2004). A qualidade oocitária é o fator primário que afeta a performance reprodutiva em éguas velhas e mulheres, apesar das causas associadas a esse processo ainda não estarem bem definidas (CARNEVALE, 2008).

A fertilidade na vaca pode ser alterada por erros de manejo, fatores nutricionais e ambientais. Esses, por sua vez, podem mascarar efeitos da idade (BEARDEN & FUQUAY, 1984; GORDON, 1996). Erickson (1966), ao avaliar ovários de vacas Holandesas retirados cirurgicamente e também coletados em abatedouros, encontrou folículos normais em vacas com idade superior a 10 anos, além da presença de folículos atrésicos predominando em idades avançadas. Exaustão folicular ovariana ocorre entre 15 e 20 anos na vaca, que pode viver

além do período pós-reprodutivo por seis anos em média (VOM SAAL et al., 1994).

Características endócrinas e reprodutivas de envelhecimento dos ovários foram caracterizados numa série de recentes estudos em que vacas velhas foram comparadas com as filhas (MALHI et al., 2008). As concentrações circulantes de FSH foram consistentemente mais elevados em vacas velhas do que nas suas filhas, e o modelo esperado de secreção de FSH e a onda de emergência, o recrutamento, foi mantido em vacas velhas, ou seja, cada onda folicular ovariana foi precedida por uma onda de FSH circulante. Apesar dos elevados valores de FSH, menos folículos de 4-5 mm foram recrutados em cada onda folicular em vacas velhas quando comparada com a dinâmica das suas filhas. Esta interessante relação inversa entre o número de folículos recrutados em uma onda e as concentrações máximas de FSH também tem sido relatada em estudos que documentam a repetibilidade do número de folículos entre indivíduos. Ciclos com duas ondas de crescimento folicular ocorreram em 60% dos ciclos estrais de vacas velhas e com três padrões de ondas ocorreu no restante, da mesma forma que as suas filhas (MALHI et al., 2008). A maioria dos pares mãe-filha tiveram a mesma onda padrão, o mesmo comprimento de onda e intervalos, que não se alterou com a idade. O folículo ovulatório de vacas velhas com um padrão de duas ondas foi menor no momento da ovulação do que o das vacas jovens. O diâmetro do CL foi menor, e a concentração plasmática de progesterona em relação a idade das vacas tendiam a ser mais baixas nas velhas. Não houve efeito da sobre as concentrações circulantes de LH ou frequência de pulso. O aparecimento de uma onda adicional durante o ciclo resultou em um maior desgaste no estoque folicular do que em vacas de dois padrões de ondas (MALHI et al., 2008), fornecendo justificativa para a hipótese de que o esgotamento da reserva folicular e início da senescência reprodutiva pode ocorrer mais cedo, em indivíduos que apresentam predominantemente três versus dois padrões de ondas. Em um estudo da resposta ovariana ao tratamento superovulação, menos folículos pequenas (<5 mm) foram recrutados para a onda folicular, e menos folículos ovarianos de 6 a 8 mm, de 9 a 11 mm e de 12 milímetros desenvolveram após superovulação em

vacas velhas do que na suas filhas jovens. Em média, as vacas jovens tiveram ovulações maiores do que vacas velhas. Alterações de protocolos de superovulação são necessárias em vacas velhas de alto valor zootécnico que permanecem nos programas de transferência de embrião. O aumento da dose de FSH eleva a produção de embriões, mas não consegue eliminar efeitos negativos do envelhecimento, como má qualidade dos oócitos (DESAULNIERS et al., 1995).

Resultados de pesquisa (MALHI et al., 2008), sugerem que a fertilização ou taxas de clivagem diminuem com a idade. Menos embriões, e uma proporção maior de ovócitos infertilizados e zigotos degenerados, foram recuperadas a partir de vacas velhas, em comparação com as suas jovens filhas. Esta conclusão, foi validada pela observação de que o total de oócitos recuperados por doadoras mais velhas produziram menos de 50% de embriões, comparadas com as suas filhas jovens. A sobrevivência dos embriões obtidos a partir de vacas velhas e suas filhas após a transferência para receptoras jovens não foram diferentes. Portanto, os autores concluíram que a gestação e as perdas de embriões transferidos não diferiram entre a vaca velha versus as vacas jovens.

## **2.6 ALTERAÇÕES NO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-OVARIANO**

Enquanto na mulher a perda da fertilidade está ligada primariamente à exaustão dos folículos primordiais, há registro de que a deficiência da função hipotalâmica é o principal fator para aciclicidade em ratas senis, sem que seja necessária a perda total dos folículos ovarianos (SCHINDLER et al, 1972). Em estudo realizado em ratas, foram avaliados os efeitos da idade e do estado reprodutivo em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) neuroendócrinos glutaminérgicos, sua regulação por neurônios de GnRH e sua expressão por neurônios de GnRH. Com isso, foi proposto que as mudanças neuroendócrinas celulares, moleculares e fisiológicas nesses receptores podem estar envolvidas na transição para aciclicidade em ratas senis e em fêmeas de outras espécies de mamíferos (GORE et al., 2007; YIN et al., 2006).

O início da queda da eficiência reprodutiva é caracterizado por mudanças no perfil hormonal, detectadas por alterações no ciclo estral (SCHINDLER et al.,

1972; VOM SAAL et al., 1994). Altas concentrações de FSH e LH aumentam o estímulo ao desenvolvimento folicular, causando perda acelerada dos folículos (WAGNER et al., 1991; CAETANO et al., 1997; PACKER et al., 1998). Tais mudanças se refletem na baixa qualidade e capacidade dos folículos velhos em produzir concentrações adequadas de inibina, que exerceria efeito de retroalimentação negativa na produção de FSH. O aumento de FSH também é documentado em ratas cíclicas (HADLEY, 1996; PACKER et al., 1998; VOM SAAL et al., 1994). Além da aceleração da folículogênese, acredita-se que o excesso de LH pode ser tóxico aos folículos primordiais e induzir apoptose ou necrose, aumentando a taxa de depleção dos mesmos (FLAWS et al., 1997). De acordo com Hansen e colaboradores (2005), apesar da elevação das concentrações séricas de FSH e queda de inibina, a capacidade secretória dos folículos recrutados mantêm-se inalterada em mulheres com idade reprodutiva avançada. Em mulheres, a partir da quarta década de vida, há modificações hipotálamo-neurais na secreção de GnRH, atenuação do retro-controle positivo do estradiol e diminuição na frequência e prolongamento dos pulsos de GnRH. A hipófise responde com diminuição na densidade de receptores de GnRH, perda da sensibilidade das gonadotropinas, secreção de gonadotrofinas mais básicas com maior meia-vida, diminuição da frequência e maior amplitude dos pulsos de LH e FSH e secreção preferencial de FSH. Estas modificações associadas à aceleração do consumo folicular, explicam a elevação mais rápida de FSH após os 37-38 anos e a manutenção de concentrações quase constantes de LH até o final do período reprodutivo, e segundo esses autores, o mecanismo acima descrito provoca ciclos anovulatórios em ratas e mulheres (VOM SAAL et al., 1994; SCHINDLER et al., 1972; HADLEY, 1996; FLAWS et al., 1997). De acordo com Forcada (2007), a utilização de implantes de melatonina em ovelhas com senescência reprodutiva pode restaurar a função do sistema neuroendócrino antes comprometido pela idade.

Na vaca, o envelhecimento está associado com a elevação na concentração de gonadotropinas e a redução na concentração dos hormônios esteróides, sendo essas mudanças similares às reportadas durante o início do

envelhecimento reprodutivo na mulher. A redução no recrutamento folicular a cada onda emergida indica uma possível redução na resposta ao FSH. Nessa fase, não há registro de aumento na taxa de recrutamento, mas, sim, um desenvolvimento mais lento dos folículos dominante e ovulatório, que atingem sempre um menor diâmetro (MALHI et al., 2005).

A falha no crescimento folicular em éguas e mulheres é causada pela depleção de folículos primordiais nos ovários, suportada pela redução no número de folículos antrais. Dentro da perimenopausa, a reserva folicular está próxima da exaustão com a aproximação da menopausa. Depois de aumentar a fase folicular, o crescimento folicular intermitente foi observado antes da cessação da atividade ovariana em éguas (CARNEVALE, 2008). Após a menopausa, a produção de estradiol e progesterona virtualmente cessa, e suas concentrações no sangue se aproximam a de um animal castrado (VOM SAAL et al., 1994). Porém, o ovário na pós-menopausa exerce importante função esteroideogênica. O estroma intersticial ovariano, por estímulo das gonadotropinas, produz andrógenos, particularmente androstenediona, agora em quantidades significativas (ODELL, 1995; VIANA et al., 1998). A androstenediona produzida no ovário e no córtex da glândula adrenal é convertida em estrona nos tecidos periféricos, muscular e adiposo, sendo o principal estrógeno circulante na pós-menopausa. A conversão se eleva com a idade, obesidade e nos casos de cirrose hepática (SCHINDLER et al., 1972; HEMSELL et al., 1974; ODELL, 1995).

Em humanos, as ações biológicas do estrógeno são conhecidas, e incluem o efeito inotrópico positivo sobre o coração e na hemostasia, diminuindo a pressão arterial; os efeitos diretos nos vasos sanguíneos, causando vasodilatação e melhora no fluxo sanguíneo; as alterações na lipidemia, favorecendo a circulação de lipoproteínas de alta densidade ligadas ao colesterol (HDL-C); a degradação hepática de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) (STABENFELDT & EDQVIST, 1996; NIESCHLAG & BEHRE, 2001). Já no que se refere aos animais domésticos, não há estudos que relacionem problemas sistêmicos e deficiência estrogênica com o avançar da idade. O hormônio anti-mülleriano regula o desenvolvimento de folículos primordiais de duas formas: por estimulação

negativa da maturação folicular e por inibição da sensibilidade ao FSH em folículos em desenvolvimento, Alguns autores sugeriram a hipótese de que o hormônio anti-mülleriano pode ser usado como um marcador biológico para idade ovariana e reserva ovariana em humanos, Em estudo realizado com ratas, ao longo de suas vidas, foi demonstrada uma queda exponencial tanto nas concentrações séricas quanto ovarianas do hormônio anti-mülleriano com o avançar da idade, e a origem histológica para essa redução foi o declínio no número de pequenos folículos ovarianos expressando o hormônio anti-mülleriano (YEH et al., 2007). Ao comparar a evolução morfológica dos ovidutos em cadelas pré-púberes, de meia idade e idade avançada, Meyers e colaboradores (1984), observaram que o epitélio dos ovidutos sofre diferenciação com deciliação celular em idades avançadas em virtude da perda de estímulo estrogênico, da diminuição da razão estrógeno/progesterona ou da atuação da progesterona isoladamente. A longevidade da função ovariana em gatas não é conhecida, apesar de muitas delas não apresentarem atividade estral entre 11 e 13 anos de idade. Usualmente, fêmeas com 8 anos de idade são retiradas dos programas de cruzamento (FELDMAN, 1996).

A deposição elevada de colágeno no endométrio, a decidualização, pode diminuir a capacidade do útero em manter a gestação, pois interfere mecanicamente na vascularização uterina, necessária para a implantação e manutenção do embrião (WAGNER et al., 1991). Experimentos com implantes de blastocistos em útero de camundongos demonstraram ocorrência de proliferação de células na camada estromal, infiltração de linfócitos, e aumento de glicogênio e fosfatase alcalina (FINCH, 1978).

Estudos (HOLINKA & FINCH, 1977), em fêmeas nulíparas de camundongos com quatro e 10 meses de idade mostrou maior prejuízo da resposta decidual induzida relacionado à idade. O ganho de peso médio do útero após a decidualização foi de 50mg nos animais de 4 meses e 15 mg para os de 10 meses. Além disso, o aumento do glicogênio e da fosfatase alcalina também foi prejudicado nos camundongos de 10 meses de idade Com isso, concluiu-se que sucessivas procriações não acarretariam por si só a

perda da resposta decidual durante o envelhecimento.

A alteração progressiva da secreção endometrial que promove a implantação do embrião é determinada pela resposta do endométrio e concentração sérica e tempo de exposição à progesterona. Meldrum (1993), avaliou as taxas de concepção em mulheres acima de 40 anos, que receberam 50mg ou 100mg por dia de progesterona e mulheres com menos de 40 anos submetidas a 50mg por dia de progesterona. Com isso, foi observado aumento significativo nas taxas de concepção em mulheres acima de 40 anos que receberam 100mg por dia de progesterona, valores semelhantes aos obtidos naquelas com idade inferior a 40 anos.

## 2.7 DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial é aproximadamente 17.000 vezes menor que o nuclear e, apesar do pequeno tamanho, é responsável por codificar 13 proteínas (enzimas) essenciais para o processo de geração de energia para as atividades celulares (GIBSON et al., 1997). Tem como peculiaridade a herança exclusivamente materna, não apresentando segregação mendeliana, o que lhe propicia ser foco de muitos estudos filogenéticos. A diferença genética entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, aqueles indivíduos que possuem o cupim no dorso, já foi caracterizado com base nos genomas mitocondrial (DNAmt; LOFTUS et al., 1994) e nuclear (MACHUGH et al., 1997). Estes trabalhos mostraram evidências de domesticação independente dos dois grupos genéticos que se divergiram entre 200.000 (dados de DNAmt) e 850.000 anos (DNA nuclear) a partir de um ancestral comum. Portanto, claras demonstrações de variantes do DNA genômico presentes em *Bos indicus*, mas ausentes em *Bos taurus* foram dadas com a caracterização de microsatelites (MACHUGH et al., 1997).

O DNA mitocondrial tem sido estudado na sua provável contribuição na variação das características de crescimento, produção e reprodução. Muitos estudos já foram realizados, obtendo resultados importantes dessa sobre características ligadas à produção e composição do leite, especificamente, na percentagem de gordura, na concentração de energia e na idade ao primeiro parto

(SCHUTZ et al., 1992, 1993; BOETTCHER et al., 1996a, 1996b; HENKES et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009).

Alencar e colaboradores (1993), avaliaram o efeito da linhagem citoplasmática sobre os pesos ao nascimento, a desmama e aos 365 dias de idade de animais da raça Canchim, e constataram efeito significativo da linhagem citoplasmática sobre todas as características, embora os componentes de variância desse efeito tenham contribuído com menos de 2% da variância fenotípica. Oliveira (2005), avaliando a influência da linhagem citoplasmática sobre características de comportamento e crescimento na raça Nelore, observou redução nas variâncias aditivas diretas e maternas das características de peso a desmama, ganho de peso desmama aos 12 meses, peso ao sobreano, ganho de peso da desmama ao sobreano, perímetro escrotal e temperamento. Contudo, as maiores diferenças entre modelos foram observadas para o peso a desmama e perímetro escrotal, sendo significativas no teste da razão de máxima verossimilhança somente no peso à desmama. As diferenças observadas no peso médio a desmama entre linhagens maternas foram de 22,4 Kg.

Meirelles e colaboradores (1999), por metodologia molecular, analisaram o padrão de DNA mitocondrial nas raças Nelore, Gir e Brahman e observaram, respectivamente, que nos animais puros de origem (PO) 79%, 73% e 100% do DNA mitocondrial era do padrão taurino, enquanto nos puros de origem importada (POI), esses representavam apenas 26%, 25% e 0%, o que, segundo estes autores, confirma a participação de fêmeas *Bos taurus taurus* na formação do Zebu americano. Concluíram, diante desta descoberta, que o Zebu brasileiro é excelente modelo para o estudo da herança citoplasmática, já que permite formar dois grupos que compartilham elevada percentagem de genes nucleares, mas diferem quanto ao padrão mitocondrial

Em relação às características de produção, os primeiros trabalhos foram realizados por Bel e colaboradores (1985), e Huizinga e colaboradores (1986), em estudos sobre a influência da linhagem citoplasmática em primeiras lactações de vacas Holandesas, relataram relacionamento estatisticamente significativo entre esta e as características de produção e composição do leite. Em outro estudo

sobre da influência da herança citoplasmática sobre características de produção e composição do leite, os autores observaram que a linhagem citoplasmática foi fonte de variação estatisticamente significativa, em todos os modelos testados, tanto para percentagem de gordura como para a concentração de energia no leite (SCHUTZ et al. 1992). Schutz e colaboradores (1993), avaliando a influência citoplasmática sobre características de produção e composição do leite em vacas Holandesas, sob três diferentes metodologias de classificação molecular das linhagens citoplasmáticas, observaram efeito significativo da linhagem citoplasmática sobre a percentagem de gordura e concentração de energia em duas delas e em uma quanto à produção de gordura. Boettcher e colaboradores (1996), agrupando seus dados aos utilizados por Schutz e colaboradores (1992), encontraram que a linhagem citoplasmática contribui com 2,9% da variação total para percentagem de gordura. Em outro estudo (PELICIONI & QUEIRÓZ, 2001), os autores avaliaram o efeito da linhagem citoplasmática sobre a produção de leite em bovinos da raça Caracu e concluíram que, apesar da ínfima contribuição da linhagem citoplasmática para a variância fenotípica, sua inclusão exercia impacto sobre a variável ambiente permanente, que, por sua vez, na ausência da linhagem citoplasmática, inflacionava a variação genética aditiva direta.

## CAPITULO 2.

### **PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS LACTANTES DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDAS OU NÃO A ABLAÇÃO DO FOLÍCULO DOMINANTE PRÉ ASPIRAÇÃO FOLICULAR.**

#### **1. INTRODUÇÃO.**

O desenvolvimento de estratégias que melhorem o desempenho reprodutivo de raças *Bos indicus* é necessário para compreender melhor a fisiologia reprodutiva e suas implicações nos programas de melhoramento animal. As raças Zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação da pecuária brasileira, representando cerca de 80% do efetivo bovino nacional (CARTAXO et al., 2001). A raça Gir exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, sendo ainda eficiente na produção de leite a baixo custo, principalmente quando utilizada em cruzamentos com animais de raças especializadas para a produção leiteira, sendo por isso uma das principais raças Zebuínas utilizadas para esse fim. Os rebanhos da raça Gir, devem ser submetidos a um trabalho de melhoramento e seleção, para a produção de reprodutores e material genético (sêmen e embriões) de qualidade superior a serem utilizados nos rebanhos mestiços.

A Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) é uma biotécnica de interesse econômico, que aliada a utilização de sêmen sexado possibilita a obtenção de fêmeas de valor genético superior (GARCIA et al, 2003; BARUSELLI et al., 2006; CAMARGO et al., 2006). O desenvolvimento da metodologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) para maximizar o ganho genético e a produção animal é um desafio de pesquisa científica há vários anos, e a produção em escala comercial de embriões a partir de oócitos puncionados dos folículos ovarianos pode aumentar os benefícios do progresso genético entre gerações e contribuir para os programas de melhoramento genético ou produção animal (RUMPF, 2007).

A produção *in vitro* de embriões (PIV), incluindo aspiração folicular (OPU), maturação, fertilização e cultivo embrionário, é um exemplo de avanço

rapidamente incorporado ao setor produtivo, e que resulta em avanços significativos para a pecuária nacional, demonstrando a importância do investimento em pesquisa e desenvolvimento tecnológico nesta biotecnologia (GARCIA et al, 2005; VIANA & CAMARGO, 2007).

Portanto, a pressão para redução do intervalo de gerações, os programas de melhoramento com avaliação somente de primíparas e a criação de núcleos MOET nas raças Zebuínas, tem estimulado criadores e técnicos a empregar biotecnologias da reprodução para multiplicação das fêmeas superiores, principalmente com vacas lactantes e jovens. A multiplicação de fêmeas jovens superiores da raça Gir, aprovadas em núcleo MOET, recordistas de lactação na primeira e segunda cria, embora ainda estejam ampliando suas melhores lactações até atingirem a produção máxima por volta da quarta ou quinta cria, devem ser exploradas com as modernas ferramentas da reprodução, sem que ocorra interferência em sua vida reprodutiva normal de intervalos entre 12 a 14 meses e lactações de 270 a 330 dias. Além disso, a utilização de doadoras da raça Gir para produção de embriões F1 com raças taurinas leiteiras especializadas já é realidade no mercado de genética nas bacias leiteiras tradicionais e emergentes (BASSO et al., 2010).

Desta maneira programas que iniciem os protocolos de aspiração e produção de embriões o mais próximos do parto, e que permitam aspirações seqüenciais e não interfiram na reconcepção da doadora para uma próxima lactação são de grande interesse científico e prático. No presente trabalho foram pesquisados aspectos relacionados à técnica de PIV, utilizando doadoras da raça Gir da subespécie (*Bos taurus indicus*), visando identificar a influência da prévia aspiração do folículo dominante e das diferenças em relação ao período de dias pós-parto para início das aspirações, no desempenho da doadora.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos compreende três etapas desenvolvidas no laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de

mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos. A obtenção de oócitos disponíveis para PIV ocorre através da técnica de aspiração folicular transvaginal (OPU), e tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (BOLS et al., 2004). A PIV mostrou ser uma alternativa à superovulação convencional para a produção de embriões (TE), possibilitando a obtenção de um maior número de gestações de uma doadora em determinado período de tempo (BOUSQUET et al., 1999).

Tanto na TE quanto na PIV, ocorre grande variabilidade na produção de embriões por doadora (SLENNING & WHEELER, 1989; GALLI et al., 2003). No entanto, a maior produção de embriões pelo procedimento *in vitro* em relação à TE tem feito com que a maioria dos técnicos e criadores optem pela PIV, buscando mais rapidez na produção de descendentes de vacas de linhagens superiores. A biotecnologia referente à PIV encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil alcançou uma posição de destaque frente ao número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica. São descritas diferenças existentes nos diversos parâmetros da fisiologia ovariana em Zebuínos, como número de ondas de crescimento, momento da divergência, maior número de folículos recrutados por onda, tamanho máximo dos folículos, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular, etc. (RHODES et al., 1995b, FIGUEIREDO et al., 1997; DAYAN et al., 2000, SENEDA et al., 2002, VIANA et al., 2000b, SARTORELLI et al., 2005). Estas diferenças parecem estar associadas a grande variação na resposta ao tratamento superovulatório convencional em Zebuínos (BARUSELLI et al., 2006), mas determinam maior número de folículos em crescimento nos ovários e, conseqüentemente, no maior número de oócitos recuperados pela OPU (VIANA et al., 2004). A comparação de resultados obtidos com doadoras *Bos taurus* (WAGTENDONK-DE LEEUW, 2005), favoreceram a difusão desta biotécnica nas doadoras zebuínas. Considerando-se que as taxas de fertilização, clivagem, produção de blastocistos e gestações são relativamente similares entre laboratórios, diferenças no número de oócitos obtidos de cada doadora podem determinar a viabilidade desta biotecnologia (VIANA & CAMARGO, 2007). A repetibilidade no recrutamento folicular em uma mesma doadoras (BONI et al.,

1997) é a logística mais simples na recuperação dos oócitos, quando comparada com a TE, assim como o uso de sêmen sexado para cromossoma X na bovinocultura leiteira (HAYAKAWA et al., 2009), que também permitem tornar a FIV mais competitiva e a biotecnologia de futuro para o melhoramento e produção animal.

A competência do oócito obtido pela aspiração folicular transvaginal parece não ser influenciada pelo tamanho do folículo (LONERGAN *et al.*, 1994; SENEDA et al., 2001), mas o mesmo não ocorre em relação à taxa de recuperação, que foi significativamente superior para folículos menores ou iguais a 4 mm (SENEDA et al., 1999). Já foi demonstrado que folículos menores viabilizam recuperação oocitária mais eficiente (SENEDA et al., 2001). PAVLOK e colaboradores (1992), também observaram melhor desempenho na produção de blastocistos quando foram aspirados oócitos de folículos médios (2-4 mm) e grandes (4-8 mm) em comparação com oócitos aspirados de folículos pequenos (1-2 mm). Hendriksen e colaboradores (2000), concluíram que a competência para o desenvolvimento *in vitro* é maior para oócitos oriundos de folículos maiores que 6-8 mm quando comparado com folículos de 3-6 mm. No entanto, Carolan e colaboradores (1996), não observaram influência do tamanho folicular sobre a maturação do oócito. Resultado similar foi obtido por Seneda e colaboradores (2001), avaliando oócitos oriundos de folículos pequenos (<4 mm) e grandes (>4 mm) aspirados *in vivo*.

Em função do estágio do desenvolvimento folicular, Machatkova e colaboradores (1996), demonstraram que oócitos aspirados nos dias 14 a 16 do ciclo estral apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento embrionário quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9. Em outro trabalho, concluiu-se que o desenvolvimento até blastocisto foi significativamente maior em oócitos colhidos durante a fase de crescimento folicular, independentemente do diâmetro do folículo (HAGEMANN, 1999). Por outro lado, em relação à onda folicular, Vassena e colaboradores (2003), demonstraram que a aspiração folicular nos dias 2 ou 3 da nova onda folicular (próximos da divergência folicular) proporcionaram uma baixa produção de blastocistos, possivelmente devido à menor competência oocitária e que o melhor

momento para recuperação seria no dia 5 (VASSENA et al., 2003). No entanto, em trabalhos mais recentes não houve diferença na produção de blastocistos quando os oócitos foram aspirados nos dias 2, 3 ou 5 da onda folicular (HENDRIKSEN et al., 2004, MACHATKOVÁ et al., 2004). Por outro lado, nas fases mais avançadas do período de dominância, nos dias 7 ou 8, houve queda na produção, concluindo-se que neste período o estágio avançado de atresia compromete a competência oocitária nos folículos subordinados (VASSENA et al., 2003, MACHATKOVÁ et al., 2004, HENDRIKSEN et al. 2000, 2004). Em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) aspiradas nos dias 3 e 5 da onda folicular, o número total de oócitos e a percentagem de blastocistos foram maiores do que os aspirados nos dias 7 e 9 (MELO, 2008).

A remoção do folículo dominante leva ao início de um pico de FSH, responsável pela emergência de uma nova onda de crescimento folicular, cerca de dois dias após a ablação por punção ovariana guiada por ultrassonografia (ADAMS 1994; BERGFELT et al., 1994). Além disso, é citado na literatura que somente a aspiração folicular pode controlar o crescimento folicular, promovendo a emergência de nova onda folicular após 1 a 2 dias (BERGFELT et al., 1994; CAVALIERI et al., 2001). A presença do folículo dominante reduz significativamente a competência dos oócitos inclusos em folículos subordinados (HENDRIKSEN et al., 2004), além de interferir no número de folículos visualizados no momento da aspiração folicular (TORRES JUNIOR et al., 2006). Seneda e colaboradores (2001), mostraram melhor eficiência no número de oócitos recuperados a partir de folículos <5 mm de diâmetro. Por outro lado, com folículos > 5mm, espera-se encontrar maior número de folículos atrésicos, em razão da dominância folicular que ocorre nos bovinos (GINTHER, 2000).

Anestro é o estado de aclicidade ovariana, refletido pela completa inatividade sexual sem manifestação de estro e esta associada à presença de ovários estáticos e lisos, pois, apesar do desenvolvimento folicular ocorrer, nenhum dos folículos que inicia o crescimento chega a maturar e, conseqüentemente, ovular (MORO et al., 1994). Uma das importantes habilidades da vaca é a capacidade de utilizar suas reservas energéticas corpóreas em

períodos de balanço energético negativo (BEM), para suprir o metabolismo basal, o crescimento, a lactação, a manutenção da saúde e, ainda, a função reprodutiva (WRIGHT et al., 1987; EDMONSON et al., 1989). Inúmeros trabalhos científicos mostram que as vacas apresentam alta demanda energética no período pós-parto, e sabe-se que vacas que parem magras, sem reservas corporais, e que perdem muito peso nos primeiros meses após o parto, entram em prolongado período de anestro (BUTLER, 1990). Portanto, durante o final da gestação, quantidades suficientes de energia devem ser armazenadas nos tecidos corporais, na tentativa de suprir o BEN.

Na literatura vários estudos associaram a nutrição à redução da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causas determinantes o BEN, evidenciado pela diminuição do escore da condição corporal no pós-parto (MOREIRA et al., 2000; LOPEZ-GATIUS et al., 2002), e pela própria condição corporal ao parto (FERREIRA & TORRES 1997; FERREIRA et al., 2005b). Para Randel (1990), peso e condição corporal ao parto são indicadores funcionais da posterior função reprodutiva, uma vez que, nutrição protéica e ou energética inadequada no pré ou no pós-parto reduz a taxa de concepção ao primeiro serviço, ocasionando aumento do período de serviço e, conseqüentemente, prolongamento do intervalo de partos (IP).

Diversos autores recomendam o acompanhamento do escore da condição corporal (ECC), uma vez que ele se mostra como um reflexo da condição nutricional (SHORT et al., 1990; ARREGUIN et al., 1997) em vacas de corte (RAE et al., 1996) e leite (WILDMAN et al., 1982; EDMONSON et al., 1989). O ECC é determinado por avaliações visuais e ou táteis de locais definidos do corpo, sendo que elas podem variar tanto nos pontos a serem examinados, como no número de locais a serem observados e avaliados (WILDMAN et al., 1982; WAGNER et al., 1988; EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990; FERGUSON et al. 1994; LASSEN et al., 2003; ROCHE et al., 2004). A Em vacas de leite, podemos verificar a existência de uma condição corporal ideal para cada fase da lactação e esta é uma ferramenta que otimiza a produção de leite, minimiza os problemas reprodutivos e maximiza o retorno econômico (GEARHART et al., 1990). Por outro

lado, o baixo ECC ao parto também reduz taxas de prenhez ao primeiro serviço (ECC < 2.5) e aumenta os dias em aberto (BCS  $\leq$  3,5; LOPEZ-GATIUS et al., 2003). Uma maior perda da condição corporal no início da lactação também está relacionada com pior capacidade reprodutiva (PRYCE et al., 2001).

### 3. OBJETIVOS

Avaliar em vacas da raça Gir a influência da ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração folicular durante o período pós parto, quanto à quantidade e qualidade dos oócitos aspirados, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Determinar qual o período pós parto mais adequado para o início da aspiração folicular, com menores prejuízos a lactação e reconcepção das doadoras.

### 4. HIPÓTESES

A ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração folicular (OPU), aumenta o número de oócitos e blastocistos comparada a OPU realizada nos períodos aleatórios da onda folicular.

A ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração folicular (OPU), aumenta a proporção para oócitos totais e viáveis comparada a OPU realizada nos períodos aleatórios da onda folicular.

Oócitos aspirados até 30 dias do pós-parto produzem menos embriões do que oócitos obtidos em períodos entre 30 a 120 dias pós parto.

A ordem de parto das doadoras influencia a quantidade e qualidade dos oócitos aspirados, na fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

O escore de condição corporal da doadora no pós-parto influencia a quantidade dos oócitos aspirados, a fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. LOCAIS

Os trabalhos foram desenvolvidos na Unidade de Pesquisa da EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, no município de Uberaba/MG, entre janeiro e novembro de 2010.

A fazenda Experimental Getulio Vargas da EPAMIG localizada na cidade de Uberaba MG, a 19° 45´ 56” de latitude sul e 47° 57´ de longitude oeste, a altitude de 774 m. O clima da região é do tipo tropical semi-úmido e a temperatura média é de 21,4° C, com variação de 20,0° C em 1970 a 25,2° C em 1959, sendo a máxima de 23,2° C e a mínima de 19,4° C. A precipitação anual média é de 1684,6 mm, com variação de 701,4 mm em 1963 a 2.158,6 mm em 1983. A umidade média relativa do ar é de 71,4%, com variação de 60,3% em 1954 a 91,8% em 1981, dados obtidos na Estação Climatológica Principal de Uberaba – EPAMIG/INMET (2009).

As fertilizações e cultivo *in vitro* foram realizadas no Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UNESP Jaboticabal SP.

### 5.2. CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA DE PRODUÇÃO

#### 5.2.1 MANEJO DAS DOADORAS

As vacas secas (120 dias entre a secagem e o parto) foram manejadas em condições de pastagem durante o período das chuvas, recebendo mistura mineral à vontade, não sendo fornecida suplementação concentrada, pois a recuperação das reservas corporais é conseguida somente com a utilização da pastagem que permite ganhos de peso de 0,7 kg/dia.

Durante o período experimental dos partos previstos, as vacas em lactação receberam silagem de milho como volumoso, sendo fornecida *ad libitum*, sendo sua distribuição realizada três vezes por dia. Normalmente é observado consumo de silagem de 28 kg de matéria verde/vaca/dia (9,9 kg de matéria seca/vaca/dia).

Nessa época são disponibilizados dois kg de concentrado para cada fêmea para adaptação a dieta pós parto.

Imediatamente após o parto, as vacas receberam quantidade de concentrado compatível com o lote de maior produção até os 40 dias de lactação. Este manejo visou diminuir a perda de peso imediatamente após o parto, proporcionando período de serviço mais curto, permitindo a vaca expressar seu potencial produtivo. Nessa época o concentrado é utilizado na proporção de 1 kg de concentrado para cada 3,8 kg de leite produzido.

No sistema de confinamento as vacas foram alojadas em piquetes coletivos, providas de sombreamento natural, bebedouros e cochos para o fornecimento da ração e da mistura mineral. A ração, à base de farelo de milho, farelo de soja, farelo de algodão e uréia, teve uma composição mínima. (tabela 1. No anexo)

Independentemente da época do ano o lote de primíparas recebeu um kg de concentrado adicional à quantidade em relação ao lote de vacas, para atender exigências nutricionais maiores. Esta prática teve o objetivo de identificar o potencial produtivo das novilhas de primeira cria, manter o seu desenvolvimento e promover o rápido retorno ao cio pós-parto.

Também, foram procedidas às vacinações no pré-parto e realizados os controles rotineiros de ectoparasitos e endoparasitos. Foi fornecido sal mineral, durante todo o período experimental com os níveis de garantia por kg do produto. (tabela 2 no anexo).

Todas as matrizes foram avaliadas para escore da condição corporal (ECC), aos 15 dias após o parto em uma escala de 1 a 9 (Quadro 1)(Figura 5) (FERREIRA et al., 2005a), sendo encontradas vacas de 3 a 7, com ECC médio de  $4,35 \pm 1,18$ . Quadro1 e figura 1 no anexo.

Durante o período experimental todas as vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia com a presença do bezerro, sem uso de qualquer estímulo hormonal para a “descida” do leite. Após a ordenha, as vacas e os bezerros eram separados ainda na sala de ordenha mecânica.

### **5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

O experimento foi conduzido utilizando-se 49 vacas da raça Gir Leiteiro, do rebanho experimental da EPAMIG, registrado na ABCZ Associação Brasileira de Criadores de Zebu. Os partos ocorreram de 18 de fevereiro a 8 de agosto de 2010, com peso médio 15 dias após o parto de aproximadamente  $431,2 \pm 57,7$  Kg, com idades de 40 a 156 meses na data do parto, e com fêmeas da primeira a sétima ordem de parto. Das vacas experimentais, 27 eram multíparas e 22 primíparas. Estas doadoras não foram submetidas à aspiração folicular (OPU) anteriormente, e nem sofreram qualquer tipo de controle farmacológico do ciclo estral, tanto para sincronização do estro ou da ovulação assim como não houve tratamentos superovulatórios. Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e ou recrutamento folicular, e todas as vacas tiveram seu sistema reprodutivo avaliado através da ultrassonografia no pós-parto e no momento das aspirações foliculares e ablação do folículo dominante.

### **5.4. TRATAMENTOS**

O tratamento principal consistiu na aspiração do folículo dominante (ablação) (AFD), ocorrendo à aspiração dos folículos subordinados acima de seis mm de diâmetro, com o objetivo de induzir a emergência de uma nova onda folicular. Este momento foi considerado como dia zero. Após a AFD as doadoras foram submetidas à aspiração folicular no dia três, da nova onda folicular. Este procedimento foi realizado, para que todas as doadoras deste tratamento, fossem aspiradas no mesmo dia da onda de crescimento folicular. O intervalo das OPUs, independentemente a ablação do folículo dominante, foram de no mínimo 21 dias. Isto permitiu o restabelecimento da atividade ovariana, evitando que as repetidas aspirações prejudicassem o índice de recuperação de oócitos, assim como a sua qualidade ao longo do experimento. As doadoras, respeitando uma equivalência para primíparas e multíparas, foram distribuídas em dois grupos de datas pós-parto para início das aspirações por no máximo cinco vezes por vaca.

- ❑ Grupo 1- aspirações foliculares iniciando aos 14, 35, 56, 77 e 98 dias pós-parto.
- ❑ Grupo 2- aspirações foliculares iniciando aos 28, 49, 70, 91 e 112 dias pós-parto.

Desta maneira, o delineamento foi estabelecido conforme mostrado na figura 1.

Embora, as aspirações foliculares tenham sido, na sua maioria, realizadas no mesmo dia da semana, durante o período experimental, como as datas do parto das doadoras naturalmente não coincidiram com as datas previstas, as datas reais das aspirações em relação a data do parto, tiveram uma amplitude maior. Neste experimento todas as vacas tiveram parto normal, no entanto, as aspirações mais próximas do parto, ao redor de 10 a 15 dias especificamente, mostravam maior dificuldade de manipulação uterina, embora sem interferência na realização dos trabalhos.

Portanto, para análise dos dados, com maior equilíbrio numérico, foram criadas as classes de dia após o parto para início das aspirações (DPPC), divididas em quatro períodos;

- ❑ DPPC1 – < 34 dias pós-parto.
- ❑ DPPC2 – de 35 a 54 dias pós-parto.
- ❑ DPPC3 – de 55 a 74 dias pós-parto.
- ❑ DPPC4 – > 75 dias pós-parto.

Também para efeito de análise, com melhor equilíbrio dentro dos grupos estudados, as vacas avaliadas foram distribuídas em primíparas e múltíparas (ORDPART).

Para estudo do período de aspiração folicular, foram avaliados os meses de aspiração (MESASP).

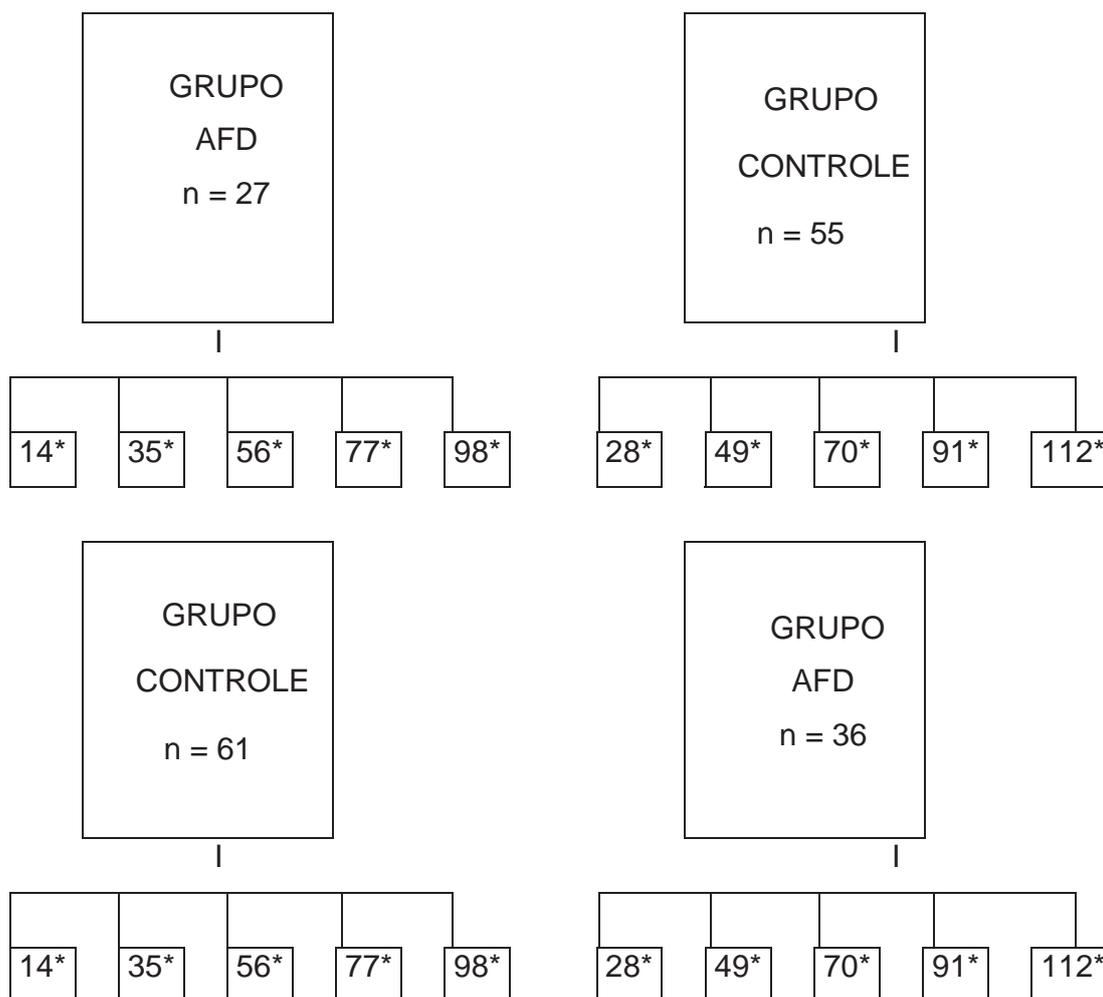


Figura 1 – Distribuição das vacas Gir lactantes nos grupos de tratamentos de ablação do folículo dominante (AFD) *versus* grupo controle, e subgrupos acordo com o início de aspiração no pós parto de 14 ou 28 dias.

\*Dias do pós-parto ao início das aspirações. n=número de aspirações por grupo de vacas.

Para efeito de análise foram criadas classes de escore corporal (CECC); com duas divisões as classes alta (ECC 6 e 7) e baixa (ECC 3, 4 e 5).

### **5.5. ASPIRAÇÃO FOLICULAR PARA OBTENÇÃO DOS OÓCITOS**

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom ALOKA® SSD 900 (US), com transdutor micro-convexo 5 MHZ, acoplado em uma guia de aspiração trans-vaginal. As aspirações foram realizadas com agulha hipodérmica descartáveis 40 X 9 (20G, Becton Dickson®) e sistema de aspiração Handle e Cook® adaptado a dupla via de aspiração. Foi utilizada uma bomba de vácuo, e a pressão de vácuo/vazão foram ajustadas previamente em 14 mL de água/minuto em cada fase do experimento. Antes de cada OPU foi realizada anestesia epidural com 3-5 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil). Após a higienização da região perineal com água e álcool 70%, a guia de aspiração acoplada com o transdutor do US era inserida até fornix vaginal, com auxílio de manipulação trans-retal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visualização no monitor do US. Os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e a bomba de vácuo era acionada iniciando as aspirações dos folículos. Este procedimento foi realizado em todos os folículos acima de 2 mm visualizados em cada ovário. O meio de aspiração e lavagem do sistema era composto de PBS, e heparina sódica (10.000 UI/L).

### **5.6. TRANSPORTE, LAVAGEM E SELEÇÃO DOS OÓCITOS.**

O fluído obtido em cada tubo de aspiração era transferido para um filtro de coleta de embriões e lavado com PBS até que o conteúdo se tornasse translúcido, logo o material retido no filtro era transferido para placa de Petri de 90mm de diâmetro feita em poliestireno. A procura dos oócitos era realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio com luz transmitida e aumento de 40 a 80 vezes. Os oócitos revestidos ou não de células do *cumulus* eram transferidos para uma placa de poliestireno de 35mm contendo meio TCM199, suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 20 mM de hepes, 10% de SFB, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg de amicacina/mL de meio. Após a procura os oócitos eram classificados quanto ao revestimento com células do *cumulus* compacto em oócitos totalmente revestidos e parcialmente revestidos, revestimento com células

do *cumulus* expandido e desprovidos de células do *cumulus*. Quanto ao aspecto do ooplasma foi avaliado a granulação e a presença de manchas claras ou escuras. Os oócitos selecionados foram classificados segundo LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. (1987), onde:

- a) Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;
- b) Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oócito escuro e irregular;
- e) Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Foram selecionados para transporte e maturação, oócitos de GI, GII, GIII, e desnudos (com citoplasma homogêneo).

### **5.7. MATURAÇÃO *IN VITRO***

O meio base utilizado para a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV) foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco® 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado com 25mM de bicarbonato de sódio, 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094), 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico®), 2µg/mL de ITS (Sigma I-1884), 1µg/MI de antioxidante (Sigma A-1345) e soro fetal bovino (Crypion®). A maturação foi completada para 24 horas em microgotas de 100uL de meio de maturação sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

## 5.8. FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Para a fecundação os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL-Sêmen e uma vez em FIV gotas para remoção da fonte protéica utilizada na maturação e parte das células do *cumulus*. Realizado o procedimento de lavagem dos oócitos de cada grupo experimental foram transferidos para gotas de 50uL de FIV gotas sob óleo mineral. Foram utilizadas palhetas de sêmen sexado para cromossoma X de uma única partida, de quatro touros da raça Gir com histórico conhecido na PIV, distribuídos entre os grupos experimentais, sem efeito dos touros. Foi utilizado somente um touro para cada aspiração. O sêmen era descongelado em água a 35-37<sup>0</sup>C por aproximadamente 20 segundos. As palhetas foram secas em gase estéril, uma das extremidades vedadas foi cortada e com o auxílio de uma haste de aço inox o lado de vedação com algodão e álcool polivinílico foi utilizado como êmbolo para liberação do sêmen em um tubo ependorff de 1,5mL contendo gradiente descontínuo de 45% 90% de Percoll. O sêmen foi submetido a uma força centrífuga de 3620g (4500rpm) por 7 minutos. O sobrenadante era removido e o sedimento resuspenso com 1mL de meio FIV gotas. Procedia-se nova sedimentação por centrifugação com uma força 1.110g (2.500rpm) durante 5 minutos. O pellet formado era utilizado para a fertilização, sendo que a cada gota de fecundação, já contendo os oócitos eram adicionados 8uL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, sêmen e oócitos foram co-incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5<sup>0</sup>C.

## 5.9. CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen, onde tiveram parte das células do cumulus removidas por sucessivas pipetagens. Logo após, eram lavados em meio de cultivo e transferidos para microgotas de 100uL de meio SOFaa suplementado com 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094), 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico) 2,5% de SFB (Crypion®) e 8mg/mL de BSA (Sigma A-8806). A taxa de clivagem foi avaliada 24 horas depois dos prováveis zigotos serem colocados

em cultivo. As trocas de meio (*feed*) eram realizadas no terceiro e quinto dia de cultivo, onde eram retirados 50ul de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50uL de meio SOFaa fresco (pré equilibrado). No sétimo dia de cultivo eram realizadas as contagens de embriões formados e as classificações quanto o estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido).

## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analyses System 2000 (SAS®). Os dados foram testados quanto a normalidade (anexo) dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Data Analysis. Como não obedeceram as premissas e a normalidade não foi comprovada, empregou-se o procedimento GEMOD de análise de variância não paramétrica. O nível de significância para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada resposta. Para o nível de significância de 0,05 até 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

Para análise estatística os dados de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos foram analisadas pelo programa GENMOD do SAS e considerado os dois tratamentos (controle e ablação do folículo dominante pré aspiração folicular), o mês do parto, as classes de dias pós parto, as classes de ordem de parto, a ordem de aspiração por vaca e a classe de escore corporal da vaca no pós parto. Parâmetros como produção de leite no dia da aspiração, peso da vaca e dia de manifestação do primeiro cio pós-parto foram incluídos no modelo inicial sendo descartados posteriormente por não serem significativos.

## 7. RESULTADOS

O desempenho zootécnico geral do rebanho estudado está expresso pelas médias, desvios-padrão, mínimos, máximos e coeficientes de variação em cada uma das características descritas (tabela 1). Para produção de leite e duração da lactação foram utilizados os registros válidos para as lactações encerradas.

Tabela 1 – Características de produção e reprodução das vacas Gir (*Bos taurus indicus*) utilizado no experimento.

<i>Característica</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>média</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
Produção de leite na lactação (kg)	2.048	5.545	3.848	1225	27,6%
Duração da lactação (dias)	220	365	293	43	14,7%
Peso (kg)	310	570	432	57	15,3%
Escore corporal (escala 1 a 9)	2	7	4,35	1,18	15,3%
Produção de leite 1ª pesagem (kg)	4,6	16,8	10,79	3,46	28,0%
Produção de leite 2ª pesagem (kg)	4,8	16,0	10,45	2,89	28,0%
Produção de leite 3ª pesagem (kg)	3,4	16,2	10,00	3,70	28,0%
Produção de leite 4ª pesagem (kg)	2,6	15,8	9,91	3,69	28,0%
Intervalo parto primeiro cio (dias)	28	221	115,17	47,7	37,1%

S = desvio-padrão. CV = coeficiente de Variação.

Para as informações de desempenho foram avaliadas 49 vacas em 198 aspirações. Foram coletados 6.034 oócitos totais, dos quais 3.884 considerados viáveis, que resultaram em 1.114 blastocistos. O número médio de oócitos totais por sessão de aspiração foi de  $31,19 \pm 16,49$  e a média por sessão de oócitos viáveis aspirados foi de  $20,04 \pm 10,58$  percentual médio de 64,3% de viabilidade. O número de blastocistos por sessão de aspiração foi de  $5,70 \pm 4,92$  com taxa de conversão média de oócitos viáveis em embrião de  $31,87 \pm 27,04$  % (tabela 2).

Neste trabalho, todas as doadoras mesmo sendo aspiradas pela primeira vez com aproximadamente 15 ou 30 dias do pós-parto, e repetidas após aproximadamente, 21 dias da primeira aspiração, ciclaram normalmente e ficaram gestantes após o término do experimento. O intervalo de parto ao primeiro estro foi de  $115,17 \pm 47,78$  dias, com manifestações no período mínimo de 28 e máximo

de 221 dias (tabela 3). Vacas multíparas tinham em média  $3,6 \pm 1,7$  partos, eram com maior peso vivo, de maior produção de leite no período experimental, e mostraram menor tempo de manifestação do primeiro cio pós-parto, sendo que esta categoria manifestou o primeiro cio 42 dias antes das primíparas (tabela 3).

Tabela 2 – Número de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração das vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*).

Característica	mínimo	máximo	média	S	CV
Produção de oócitos totais (n)	3	91	31,19	16,84	53,9 %
Produção de oócitos viáveis (n)	2	53	20,04	10,87	54,2 %
Produção de blastocistos (n)	0	27	5,70	4,92	86,2 %
Taxa conversão oócito/embrião (%)	0	100	31,87	27,04	84,8 %

S = desvio-padrão; CV = coeficiente de Variação.

Tabela 3 – Desempenho por categoria animal (primíparas e multíparas) das vacas Gir avaliadas nas características de; peso vivo (kg), escore da condição corporal (ECC), produção de leite (kg) durante o período experimental e dias de manifestação do primeiro cio pós parto. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (DP).

	n	OP	PESO	ECC	LEITE				CIOPP
					1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	
<b>PRIMÍPARAS</b>	<b>23</b>								
Média		1	423,7	4,6	7,92	8,02	6,03	5,25	141,6
DP		0	28,8	0,8	2,5	2,3	2,0	2,25	43,6
Max.			484	6	12,4	12,3	9	8,6	221
Mín.			370	3	4,6	4,8	3,4	2,6	80
<b>MULTÍPARAS.</b>	<b>26</b>								
Média		3,6	473,9	4,7	12,94	11,98	11,99	11,77	99,9
DP		1,7	47,3	1,4	2,5	2,1	2,5	2,2	42,4
Max.			570	7	16,8	16	16,2	15,8	159
Mín.			400	2	9,2	8,4	8,6	7,2	38

OP = ordem de parto. CIOPP = dias de manifestação do primeiro cio pós-parto. ECC = escore da condição corporal. LEITE = pesagens mensais realizadas durante o período experimental. DP = desvio padrão. n = número de animais por categoria.

Os números de oócitos totais e viáveis, e de blastocistos por vaca, não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os meses da aspiração, a classe de dias pós-parto, a ordem de parto e de aspiração (tabela 4).

Tabela 4 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nas classes de dias pós-parto, nas classes do mês de aspiração folicular, nas classes da ordem de parto, e das ordens de aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>Oócitos totais</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>n</b>
<b>Tratamento</b>				
<b>Classes de dias pós-parto</b>				
DPPC 1 < 34 dias pós parto.	20,57 $\pm$ 5,90	14,12 $\pm$ 3,79	4,05 $\pm$ 1,76	40
DPPC 2 de 35 a 54 dias.	24,45 $\pm$ 4,49	17,79 $\pm$ 2,88	3,55 $\pm$ 1,34	38
DPPC 3 de 55 a 75 dias.	27,02 $\pm$ 3,97	17,80 $\pm$ 2,54	4,39 $\pm$ 1,18	30
DPPC 4 > 75 dias pós-parto	34,76 $\pm$ 2,72	21,12 $\pm$ 1,74	6,86 $\pm$ 0,82	71
<b>Ordem de parto</b>				
ORDPART primíparas	24,94 $\pm$ 3,63	16,11 $\pm$ 2,32	4,69 $\pm$ 1,08	75
ORDPART múltíparas	28,46 $\pm$ 2,64	19,31 $\pm$ 1,69	4,74 $\pm$ 0,79	104
<b>Mês aspiração</b>				
MESASP 04	30,75 $\pm$ 8,14	21,05 $\pm$ 5,22	2,46 $\pm$ 2,43	9
MESASP 05	28,78 $\pm$ 5,18	19,61 $\pm$ 3,32	1,39 $\pm$ 1,55	24
MESASP 06	25,83 $\pm$ 4,34	17,48 $\pm$ 2,79	6,33 $\pm$ 1,30	37
MESASP 07	22,99 $\pm$ 3,78	15,28 $\pm$ 2,42	5,68 $\pm$ 1,13	41
MESASP 08	26,76 $\pm$ 3,42	17,45 $\pm$ 2,19	3,65 $\pm$ 1,02	41
MESASP 09	28,23 $\pm$ 3,54	19,58 $\pm$ 2,27	6,97 $\pm$ 1,06	32
MESASP 10	23,54 $\pm$ 6,21	13,50 $\pm$ 3,98	6,51 $\pm$ 1,85	9
<b>Ordem de aspiração</b>				
ASP1	31,94 $\pm$ 4,62	19,23 $\pm$ 2,96	6,47 $\pm$ 1,38	42
ASP2	35,32 $\pm$ 3,50	21,19 $\pm$ 2,24	5,15 $\pm$ 1,04	42
ASP3	28,88 $\pm$ 3,69	19,25 $\pm$ 2,37	5,51 $\pm$ 1,10	39
ASP4	25,03 $\pm$ 5,20	18,91 $\pm$ 3,34	5,79 $\pm$ 1,56	29
ASP5	20,47 $\pm$ 6,26	13,82 $\pm$ 4,02	2,20 $\pm$ 1,87	18
ASP6	18,54 $\pm$ 7,69	13,84 $\pm$ 4,93	3,17 $\pm$ 2,30	9

\*não ocorreram diferenças consideradas significativas  $p < 0,05$ .

DPPC = classe do número de dias pós-parto no momento da aspiração folicular.

ORD.PART. = Ordem de parto da doadora.

MESASP = Classe de mês da aspiração folicular.

ASP = ordem de aspiração.

Houve tendência ( $p=0,0861$ ), de menor número na produção de oócitos totais por aspiração nas vacas mais próximas do parto (figura 2) e

correspondendo, também a uma tendência ( $p=0,0639$ ), de menor produção de oócitos viáveis por aspiração nas vacas recém paridas (figura 3).

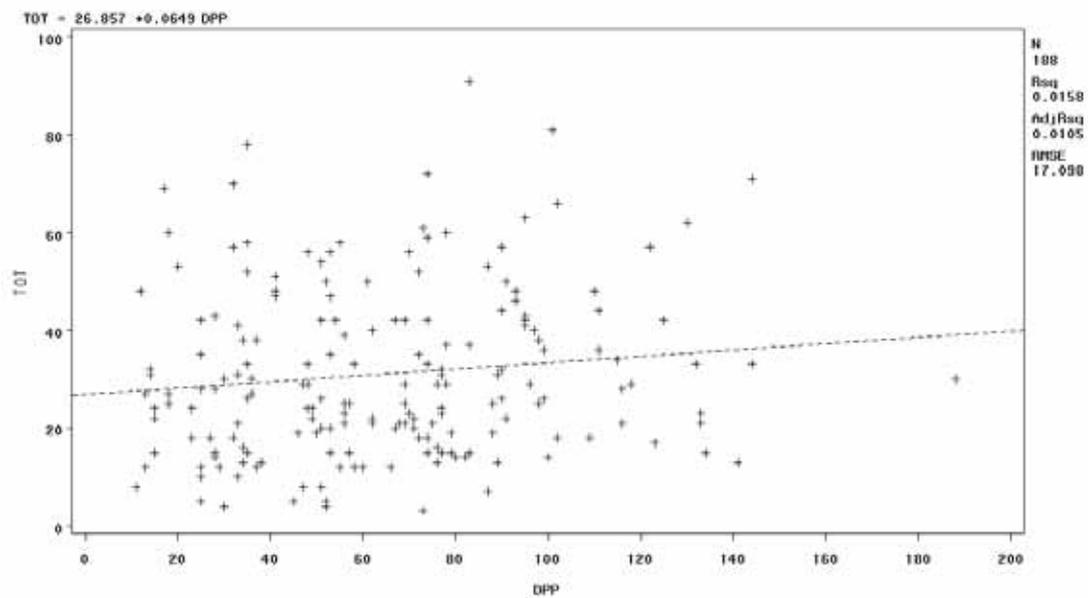


Figura 2 – Regressão do número de oócitos totais aspirados (TOT) e dias pós parto da aspiração (DPP) de doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*).

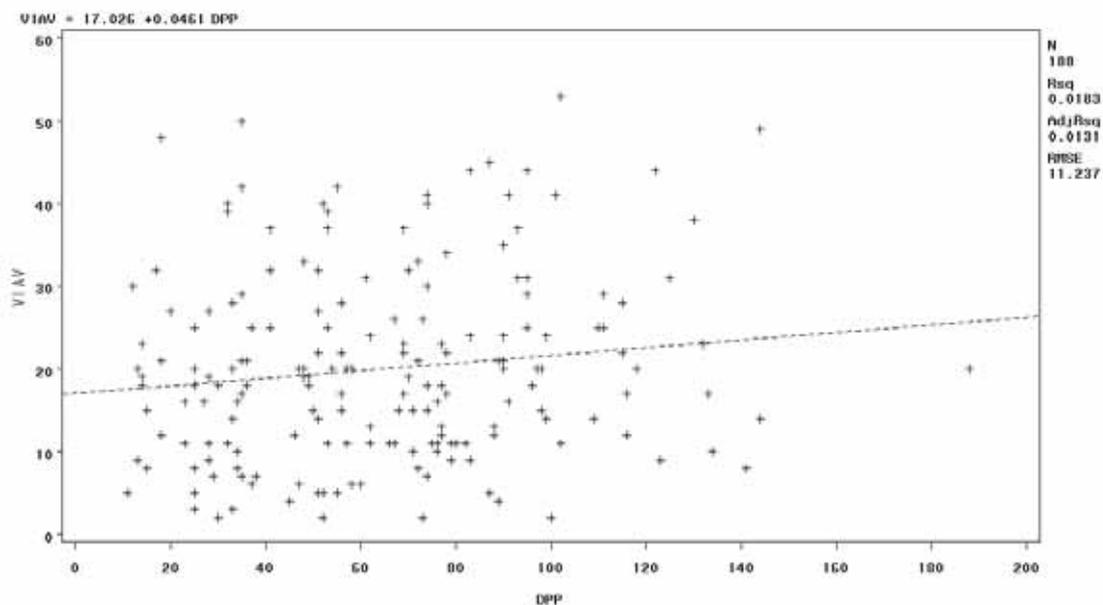


Figura 3 – Regressão do número de oócitos viáveis aspirados (VIAV) e dias pós parto da aspiração (DPP) de doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*).

A influência do escore da condição corporal (ECC) no pós-parto, na produção de oócitos viáveis foi significativa ( $p < 0,05$ ), como mostrado na regressão (figura 4), quando para cada aumento de um grau no ECC implicou no aumento de 1,65 estruturas por aspiração nas doadoras lactantes da raça Gir

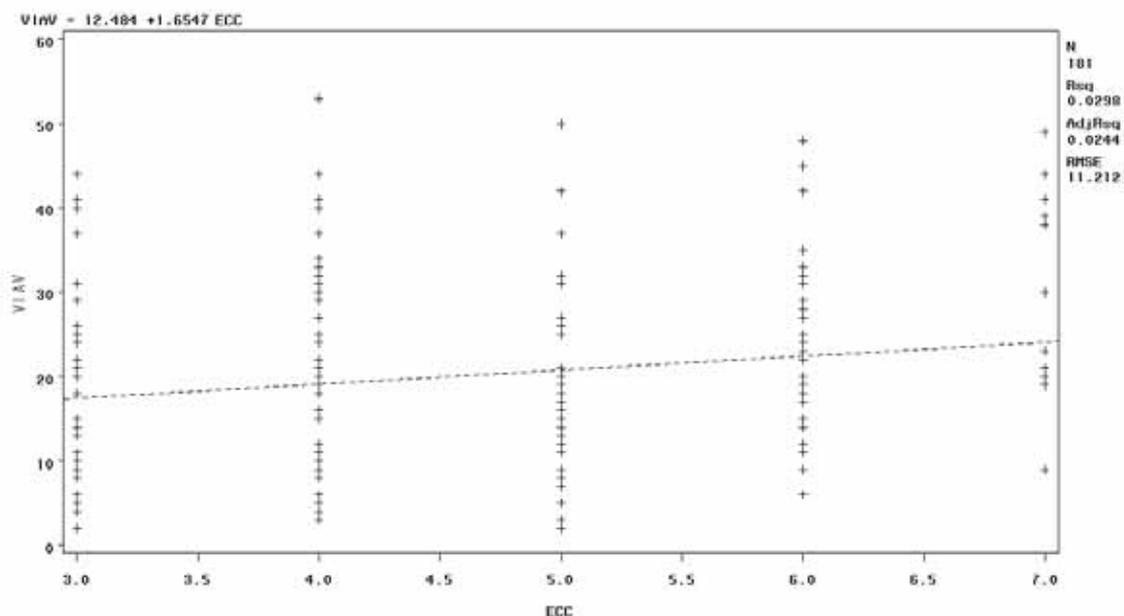


Figura 4 – Regressão do número de oócitos viáveis aspirados e escore corporal ao parto de doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*).

A criação de duas classes de ECC (CECC alto ou maior que 5 e baixo < e igual a 5), mostrou que essas classes não afetaram a produção de oócitos e blastocistos (tabela 5).

Tabela 5 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nas classes de escore corporal (CECC) alto ou baixo. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

CECC	Oócitos viáveis*	Oócitos totais*	Blastocistos
Alto (>5; n=54)	25,47 $\pm$ 2,67	16,82 $\pm$ 1,71	4,37 $\pm$ 0,80
Baixo (<5; n=127)	27,92 $\pm$ 3,59	18,60 $\pm$ 2,30	5,06 $\pm$ 1,07

CECC = classes de escore corporal pós parto: CECC alto= ECC 6 e 7, ECC baixo = 3 a 5.

Ao aplicarmos nos modelos a interação tripla: entre classe de escore corporal no pós parto (CECC), alta (ECC 6 e 7) ou baixa (ECC 3, 4 e 5), entre tratamento de ablação do folículo dominante ou controle não abladados (TRAT) e ordem de parto de primíparas ou múltiparas de duas ou mais crias (ORD.PART), ocorreu um efeito interativo ( $P < 0,01$ ) para oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos. Desta forma, criados oito grupos de vacas, de acordo com classe de escore corporal, tratamento e ordem de parto, e ocorreram diferenças para oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos. A produção de oócitos totais no grupo controle (aspiração em dias aleatórios da onda folicular sem ablação), da CECC alta foi maior ( $p < 0,01$ ), para as vacas múltiparas em relação as primíparas,  $38,24 \pm 3,59$  versus  $15,49 \pm 7,55$ . A produção de oócitos totais por aspiração, também foi maior ( $p < 0,0001$ ), dentro do grupo controle sem ablação do folículo dominante antes da aspiração folicular, para as vacas múltiparas da CECC alta em comparação as da CECC baixa,  $38,24 \pm 3,59$  versus  $21,07 \pm 3,80$ . A produção de oócitos viáveis no grupo controle (aspiração em dias aleatórios da onda folicular sem ablação), da CECC alta foi maior ( $p < 0,0001$ ), para as vacas múltiparas em relação as primíparas,  $25,89 \pm 2,30$  versus  $11,02 \pm 4,84$ . A produção de oócitos viáveis por aspiração, também foi maior ( $p < 0,01$ ), dentro do grupo controle sem ablação do folículo dominante antes da aspiração folicular, para as vacas múltiparas da CECC alta em comparação as da CECC baixa,  $25,89 \pm 2,30$  versus  $14,04 \pm 2,44$ .

Em relação a produção de blastocistos, as primíparas da CECC baixa do grupo de ablação do folículo dominante, mostraram maior ( $p < 0,05$ ) produção de blastocistos no cultivo *in vitro* em comparação as do grupo controle,  $7,02 \pm 1,35$  versus  $3,99 \pm 1,08$  respectivamente. A produção de blastocistos no grupo controle (aspiração em dias aleatórios da onda folicular sem ablação), da CECC alta foi maior ( $p < 0,0001$ ), para as vacas múltiparas em relação as primíparas,  $7,01 \pm 1,07$  versus  $1,94 \pm 2,25$ . A produção de blastocistos por aspiração, também foi maior ( $p < 0,05$ ), dentro do grupo controle sem ablação do folículo dominante antes da aspiração folicular, para as vacas múltiparas da CECC alta em comparação as da CECC baixa,  $7,01 \pm 1,07$  versus  $2,17 \pm 1,13$ .

Nos modelos estudados, para as características avaliadas de número médio de oócitos totais e viáveis, por sessão de aspiração da doadora, entre os tratamentos experimentais de ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração ou do grupo de vacas controle não foram diferentes. Foram encontradas diferenças na produção de blastocistos por sessão de aspiração no tratamento de ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração nas vacas Gir lactantes (tabela 6).

Tabela 6 –Número de oócitos totais, viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração de doadoras Gir (*Bos taurus indicus*).

<i>Tratamento**</i>		<b>Oócitos totais</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Blastocistos</b>
<i>Ablação dominante</i>	<i>folículo</i>	27,57±3,41	18,02±2,18	5,65±1,02 <b>a</b>
<i>Grupo controle</i>		25,82±3,27	17,39±2,10	3,78±0,97 <b>b</b>

\*As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste do Qui-quadrado.

\*\*Tratamentos de: ablação do folículo dominante três dias pré aspiração (n=63) e grupo de doadoras controle (n=116).

O percentual médio da proporção de blastocistos produzidos em relação ao número total de oócitos totais foi de  $19,45 \pm 14,59$  nas vacas Gir avaliadas. O percentual da proporção de blastocistos produzidos em relação ao número total de oócitos viáveis aspirados foi de  $31,89 \pm 26,05$  estruturas. O percentual da proporção de blastocistos produzidos em relação ao número total de oócitos totais e viáveis aspirados foi maior ( $p < 0,01$ ) para as vacas Gir lactantes do tratamento de ablação do folículo dominante três dias antes da aspiração folicular em relação às doadoras aspiradas em dia aleatório do ciclo (tabela 7).

Também foram encontradas diferenças por sessão de aspiração nas doadoras, na proporção de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, para os meses de realização da aspiração folicular no período experimental (tabela 8).

Tabela 7 - Proporção média por sessão de aspiração nas doadoras dos tratamentos de ablação do folículo dominante e grupo controle, de blastocistos produzidos em relação ao número de oócitos total e viáveis aspirados. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

TRATAMENTO	Blast./Oóc. viáveis*	Blast. /Oóc. totais*
	%	%
Ablação fol. Dominant. (n=65)	37,96 $\pm$ 5,19 <b>a</b>	25,55 $\pm$ 2,82 <b>a</b>
Grupo controle (n=115)	23,93 $\pm$ 4,72 <b>b</b>	15,34 $\pm$ 2,57 <b>b</b>

Blast./Oóc. Viáveis = Blastocistos produzidos em relação ao número de oócitos viáveis. Blast. /Oócitos totais = Blastocistos produzidos em relação ao número total de oócitos aspirados. \*As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Letras diferentes na mesma coluna diferem.

Tabela 8 - Proporção média por sessão de aspiração nas doadoras de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, no mês de aspiração folicular. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

VARIÁVEL	Blast./Oóc. viáveis*	Blast. /Oóc. totais*	n
	%	%	
Mês da aspiração			
MESASP 04	16,42 $\pm$ 12,9 <b>b</b>	10,93 $\pm$ 7,02 <b>bc</b>	9
MESASP 05	10,87 $\pm$ 8,48 <b>b</b>	06,15 $\pm$ 4,61 <b>c</b>	24
MESASP 06	40,44 $\pm$ 7,02 <b>a</b>	26,95 $\pm$ 3,82 <b>a</b>	37
MESASP 07	39,76 $\pm$ 6,05 <b>a</b>	25,61 $\pm$ 3,29 <b>a</b>	41
MESASP 08	23,62 $\pm$ 5,28 <b>ab</b>	15,40 $\pm$ 2,87 <b>ab</b>	41
MESASP 09	40,14 $\pm$ 5,48 <b>a</b>	24,56 $\pm$ 2,98 <b>a</b>	32
MESASP 10	45,35 $\pm$ 9,88 <b>a</b>	26,49 $\pm$ 5,38 <b>a</b>	9

\*As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,01$ . Letras diferentes na mesma coluna diferem.

## 8. DISCUSSÃO

Neste trabalho não foi feita nenhuma contagem pré aspiração, porem a literatura referencia ser o número de folículos presentes nos ovários uma das principais fontes de variação nos resultados da superovulação (VIANA et al., 1999), e fundamentalmente, que o recrutamento folicular tem sido sugerido como critério de seleção para doadoras de oócitos e embriões (BONI et al., 1997). Embora, não tenhamos feita esta avaliação prévia, já que a literatura em trabalhos com fêmeas Zebuínas tem mostrado que não ocorre diferença estatística com relação ao total de folículos visualizados na ultrassonografia com a relação do total de estruturas e oócitos viáveis recuperados através da OPU no momento da aspiração folicular (MELO, 2008).

A literatura relata que o número de folículos de cada classe de tamanho e, conseqüentemente, a população folicular total presente nos ovários de vacas da raça Gir, variam ao longo do ciclo estral, sendo o número máximo de folículos disponíveis observado no quarto dia do ciclo (FERREIRA et al., 2004). A produção de oócitos total observada teve variação entre as vacas avaliadas, com extremos de uma a 91 estruturas, e com repetição entre as aspirações da mesma doadora. A literatura cita que, Cruz e colaboradores (2009), encontraram taxa média de oócitos aspirados de 4,6 estruturas por sessão em fêmeas bovinas da raça Devon (*Bos taurus*), e 16,3 oócitos na raça Nelore (*Bos indicus*). Rubin e colaboradores (2005), avaliando a influência do grau de sangue Zebuíno na produção de oócitos revelaram que para os animais da raça Aquitânica (*Bos taurus*), a média foi de 3,7 oócitos por aspiração, para os animais da raça Canchim 13,6 e para as doadoras da raça Nelore de 18,4 estruturas. Esses resultados mostram que aumentando a porcentagem de sangue *Bos indicus* na composição racial, há também um aumento na produção de oócitos. Portanto, o número de oócitos totais aspirados nas vacas Gir deste trabalho mostram o potencial deste grupo de doadoras da raça Gir para a biotecnologia utilizada, assim como a utilização de doadoras lactantes. A superioridade de produção de oócitos por raças Zebuínas foi demonstrada por vários autores (NONATO JÚNIOR et al, 2004; RUBIN et al., 2004). Resultados obtidos anteriormente (RUBIN et al., 2004) relataram uma

média de 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, números ligeiramente inferior ao do grupo de vacas estudadas.

O objetivo do tratamento de ablação do folículo dominante neste trabalho, com resultados superiores ao grupo controle quanto ao número de blastocistos e conversão oócitos em blastocistos, está apoiado nos resultados de Melo (2008), que obteve maior número de oócitos total e maior percentagem de blastocistos quando as doadoras foram aspiradas no terceiro e quinto dia após sincronização da onda com ablação do folículo dominante. Em trabalho recente (CERRI et al., 2009a) com vacas holandesas lactantes, foi observada maior proporção de embriões degenerados naqueles provenientes de ovulações onde a dominância folicular foi mais prolongada. Em contrapartida, folículos que ovularam mais precocemente após o estabelecimento da dominância, produziram maior porcentagem de embriões viáveis. Portanto, no presente experimento, a ablação favoreu a quantidade dos embriões, por não ter exposto os demais folículos a dominância, o que ficou comprovado através da melhor qualidade dos oócitos, em virtude da significativa maior conversão de oócitos totais e viáveis em blastocistos no grupo de ablação do folículo dominante. Estes resultados estão de acordo com ampla literatura, que demonstra melhora da qualidade com a sincronização da onda e redução do efeito da dominância (WIT et al., 2000; VASSENA et al., 2003 MELO, 2008; CERRI et al., 2009). Quando a aspiração folicular é realizada independentemente da fase do ciclo estral, mais de 85% dos folículos ovarianos são atrésicos, e existem fortes evidências de que o estágio de desenvolvimento do folículo é importante para determinar a qualidade do oócito (SIRARD et al., 1999; CASTILHO et al., 2007).

Na raça Nelore, o número de folículos disponíveis para a aspiração folicular, apresenta variações conforme a fase de crescimento folicular, sendo o início da onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência na captação dos oócitos a partir de folículos menores (SENEDA et al., 2001). Na literatura é relatado, que apesar de ser influenciada pelo padrão de crescimento e pela regressão dos folículos dominantes, a principal fonte de variação no número de folículos presentes é o

padrão individual de recrutamento folicular, particularmente durante o período correspondente à primeira onda de crescimento folicular (FERREIRA et al., 2004). Neste trabalho, foi observada ampla variação individual e repetitiva entre as doadoras avaliadas, quanto ao número de estruturas recuperadas e cultivadas. Leivas e colaboradores (2003), também observaram que houve significativa variação na média do número de estruturas aspiradas entre as doadoras *Bos indicus*, submetidas ao mesmo número de sessões de OPU. Apesar do semelhante potencial entre os indivíduos da mesma raça, a variabilidade individual entre doadoras na produção de uma população viável de folículos pode influenciar os resultados da aspiração folicular (OPU) (SENEDA et al., 2006). Além disso, a literatura revela que parâmetros reprodutivos como o recrutamento e desenvolvimento folicular podem variar amplamente mesmo entre pares de gêmeas monozigóticas (MACHADO et al., 2003). Merton e colaboradores (2009), demonstraram a influência genética da doadora nos resultados de aspirações, tanto para quantidade de oócitos, como para o número de embriões produzidos, e que a herdabilidade para morfologia e competência oócitaria foram menores, mas ainda presentes. Estes achados são similares ao do experimento com as vacas Gir lactantes.

Não foram encontrados relatos na literatura com referência ao número ou qualidade de oócitos de OPU de doadoras lactantes *Bos indicus*. Dentre as formas de controle do crescimento folicular, o tratamento com progesterona e estradiol têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento e a emergência de uma nova onda folicular três a cinco dias após, devido à ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (BÓ et al., 1994, 2006). Através da administração de duas miligramas de benzoato de estradiol e 50 mg de progesterona no momento da inserção do implante de progestágeno, foi possível observar a emergência de uma nova onda folicular, em média após quatro dias (BARUSELLI et al., 2006; MORENO et al., 2001). Adicionalmente, somente a aspiração folicular do folículo dominante, também pode controlar o crescimento folicular, promovendo a emergência de uma nova onda folicular após um a dois dias (BERFELT et al., 1994; CAVALIERI et al., 2001). Hagemann e colaboradores

(1999), relataram um efeito supressivo do folículo dominante no tamanho e competência dos outros folículos. Hendricksen e colaboradores (2004), aspirando oócitos de folículos em três estágios da onda folicular, observaram que a presença do folículo dominante pode decrescer a capacidade de desenvolvimento dos folículos derivados dos folículos subordinados. Neste experimento, a aspiração de folículos no período inicial de crescimento também foi favorável, semelhante a vários grupos de pesquisa, que concluíram ser o início da onda o melhor momento para a aspiração, considerando-se a qualidade dos oócitos e o potencial de desenvolvimento embrionário (CASTILHO et al., 2007; HENDRIKSEN et al., 2004; MACHATKOVA et al., 2004; MELO, 2008). No entanto, o tratamento de ablação não influenciou no número de oócitos totais e viáveis, porém, o número de blastocistos, foi influenciado com maior produção para as vacas deste tratamento confirmando a hipótese testada.

Não ocorreu diferença no número de estruturas (oócitos e embriões) por aspiração entre as classes de dias pós-parto, embora no número de oócitos totais por aspiração ( $p=0,08$ ), e no número de oócitos viáveis por aspiração ( $p=0,06$ ) (figura 3), com uma tendência, de que estas estruturas fossem em maior número, quanto mais distante da data do parto, foi realizada a aspiração folicular. No anestro pós parto quando ocorre a involução uterina, esta é influenciada principalmente pela condição puerperal (EL et al., 1995). Este trabalho foi delineado com objetivo de comparar a produção de oócitos totais e viáveis nas aspirações próximas da data do parto, no entanto, os resultados contrariaram a hipótese testada, de que haveria menor produção e qualidade das estruturas no pós-parto recente (menos de 30 dias). Embora, tenha-se delineado para aspirar um grupo de vacas com 14 dias pós-parto calculado pela data de previsão com 290 dias após data da inseminação, como o trabalho era realizado no mesmo dia da semana, durante o período experimental, ocorreram sessões em animais com aspirações realizadas até 10 dias de pós-parto. Por outro lado, diante da informação de Bacelar e colaboradores (2010), que concluíram que o uso de protocolo de controle hormonal com associação de progestágenos, estrógenos e prostaglandina, foi mais eficaz na obtenção de oócitos, e proporcionou maior

facilidade na manipulação dos ovários durante a aspiração, em razão da redução significativa de corpos lúteos, bem como pela maior homogeneidade no tamanho dos folículos no momento da aspiração (maior o número de folículos < 5mm), no nosso experimento também pode ter ocorrido estes mesmos fenômenos. Portanto, de acordo com trabalhos anteriores feitos no mesmo rebanho em estudo (FERREIRA et al., 2007), que demonstraram doadoras com ciclicidade e presença de CL somente a partir de 26 dias pós parto. Neste trabalho, no grupo de vacas da classe com no máximo 34 dias de pós parto, provavelmente não ocorreu a presença de corpo lúteo (CL), o que teria facilitado a aspiração. Ferreira e colaboradores (2007), trabalhando as múltiparas da raça Gir deste mesmo rebanho, em boas condições corporais no pré-parto, e nutrição adequada no pós-parto, encontraram resultados da primeira ovulação após o parto ocorrendo em média aos  $63,2 \pm 23,4$  dias pós-parto, com o mínimo de 26 e máximo de 104 dias. Os autores também relataram que o intervalo parto ao primeiro cio fisiológico (ciclo curto de oito a 12 dias precedendo ciclo normal de 19 a 22 dias), foi em média de  $71,3 \pm 21,3$  dias, com o mínimo de 34 e máximo de 111 dias do pós parto. Estes autores, citaram que o ciclo curto detectado entre nestas vacas Gir foi de  $8,7 \pm 1,6$  dias, com valores mínimo e máximo de seis e 12 dias e foi detectado em 86,6 % das vacas.

O intervalo de parto ao primeiro cio foi de  $115 \pm 47,7$  dias, com manifestações no período mínimo de 28 dias e máximo de 221 dias. Estes números permitem afirmar que as aspirações realizadas com este período de serviço, podem proporcionar intervalo de parto nas doadoras de aproximadamente 13 a 15 meses. Galli e colaboradores (2001) observaram que praticamente todas as doadoras vazias entram em cio de dentro de duas semanas a partir da última aspiração de oócitos, e podem ser inseminadas com êxito. Lopes (2003), trabalhando com primíparas Zebuínas leiteiras com produção de leite de até 1.500 kg para 236 dias de lactação, citam intervalos do parto ao primeiro cio em média de  $113,7 \pm 28,7$  dias, variando de 67 a 173 dias, e intervalos maiores nas vacas que atingiram o pico de lactação mais tardiamente e naquelas com produção inicial elevada.

Ferreira e colaboradores (2007) destacaram que pode haver dificuldades para a concepção, se não existir uma boa condição corporal ao parto e um ganho de peso subsequente, o que provavelmente contribuem para a obtenção de intervalo de partos próximos dos 12 meses e ideal para um sistema de produção (FERREIRA et al., 2005b). A detecção do primeiro cio pós-parto encontrada por Ferreira e colaboradores (2007), trabalhando neste mesmo rebanho, de aproximadamente 80 dias, pode ser explicada pela condição corporal das vacas estudadas, que foi próxima de sete no parto e cinco no momento da detecção do estro, caracterizando bom escore ao parto e bom plano nutricional no pós parto. Estes achados estão de acordo com vários autores, com as afirmações de que vacas mobilizam reservas corporais para produção de leite, e que a perda significativa de peso corporal, e a diminuição do ECC no pós parto, acarretam o atraso no início da atividade ovariana pós-parto (DIAS, 1991; FERREIRA & TORRES, 1993; GALLO et al., 1996). Portanto, ocorre uma correlação negativa entre ECC ao parto e a duração de anestro pós-parto (DIAS, 1991). A condição corporal no dia do parto provavelmente constitui um dos fatores mais importantes que afetam a fertilidade subsequente (MONTIEL & AHUJA, 2005). O escore corporal cinco ao parto (escala de 1 a 9) é importante para assegurar um desempenho da reprodução aceitável no pós parto de vacas multíparas (FERREIRA & TORRES, 1993). Ferreira e colaboradores (2005b), sugerem que o escore seis ou maior ao parto (escala de 1 a 9), conduzem a manifestação do primeiro cio antes de 90 dias pós parto, o que é condizente com melhores desempenhos reprodutivos, e está de acordo com achados de maior desempenho reprodutivo nas vacas de melhor condição corporal. No experimento ocorreu efeito interativo com a produção de oócitos totais por aspiração maior dentro do grupo controle sem ablação do folículo dominante antes da aspiração folicular, para as vacas multíparas da CECC alta em comparação as da CECC baixa. Uma das melhores medidas de performance reprodutiva é o intervalo de partos, sendo considerado ideal de 12 meses, para que se obtenha o máximo da eficiência reprodutiva de uma fêmea bovina, embora, em vacas de corte com cria ao pé, especialmente primíparas (YAVAS & WALTON, 2000), e vacas leiteiras com baixo

ECC no pós-parto (BUTLER, 2003) são as categorias que apresentam maior incidência de anestro pós-parto prolongado e consequente aumento do intervalo de partos. Segundo a literatura, em vacas de leite, podemos verificar a existência de uma condição corporal ideal para cada fase da lactação e esta é uma ferramenta que permite monitorar e otimizar a produção de leite, minimizar os problemas reprodutivos e maximizar o retorno econômico, tanto em *Bos taurus* (GEARHART et al., 1990) quanto em *Bos indicus* (FERREIRA et al., 2005b). Por outro lado, a baixa condição corporal ao parto também reduz taxas de prenhez ao primeiro serviço e aumenta os dias em aberto (LOPEZ-GATIUS et al., 2003). Além de que, uma maior perda da condição corporal no início da lactação, também está relacionada com uma pior capacidade reprodutiva (PRYCE et al., 2001). Na literatura parece haver consenso em relação à condição corporal, de que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até blastocisto (LOPEZ RUIZ et al., 1996), e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também seriam doadores de oócitos menos competentes (SENEDA et al., 2000). Segundo Dominguez (1995), a proporção de oócitos normais diminuiu com o aumento do tamanho folicular e aumenta com o escore da condição corporal nos folículos pequenos e médios, e concluíram que os mecanismos de redução de fertilidade em vacas de pior condição corporal, parecem estar relacionados aos efeitos sobre o número e qualidade dos folículos.

O percentual de oócitos viáveis em relação aos oócitos totais foi de 64,2%, um pouco abaixo do relatado por Rubin (2006), que ao analisar as particularidades reprodutivas das vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) no processo de produção *in vitro* de embriões em larga escala, ao final de 1504 aspirações, obteve-se 27.966 oócitos, sendo 22.809 (81,6%) viáveis. Como estes autores não relataram o estágio fisiológico das doadoras, com o menor percentual encontrado no presente experimento, não podemos afirmar se estão relacionados ao fato de serem vacas lactantes, ou se inerentes a raça Gir.

Não ocorreram diferenças para o número de oócitos totais e viáveis e no número de blastocistos entre sessões de aspiração. Diferentes protocolos de

aspiração folicular tem sido descritos na literatura quanto ao intervalo das aspirações, e seus resultados, mostram trabalhos com 48 e 96 horas (SIMON et al., 1993), semanais (GOODHAND et al., 1999) e de aspirações duas vezes por semana (GIBBONS et al., 1994). No entanto, intervalos de três a cinco dias foram considerados ideais para proporcionar o maior número de oócitos viáveis (GALLI et al., 2001). Merton e colaboradores (2003) consideraram que a OPU quando realizada de forma descontínua (entre o início do estro e 12 dias após), permitiu que as doadoras retornassem a ciclicidade de forma natural, não afetando a função ovariana. Neste trabalho, as doadoras retornaram ao estro aproximadamente  $115 \pm 47,7$  dias após o parto, e caso fossem fertilizadas permitiria o intervalo de partos estaria dentro da média do rebanho estudado de 13,5 a 14,5 meses (LEDIC et al., 2006). Entretanto, a OPU contínua pode alterar o período de ovulação. Os estudos demonstraram que o número de oócitos não diferiu em ambos os esquemas de aspiração, mas sugeriram que a OPU descontínua seja aplicada (PETYIM et al. 2003).

Ao aplicarmos nos modelos a interação tripla: entre CECC alta ou baixa, entre tratamento de ablação do folículo dominante ou controle não ablatas e ordem de parto de primíparas ou múltiparas, ocorreu um efeito interativo ( $P < 0,01$ ) para oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos. No entanto, devido ao escore corporal pós-parto que não era possível de ser previamente delineado, ocorreu que o número de repetições foi baixo em alguns grupos de doadoras. Porém, ocorreu uma maior produção de oócitos totais por aspiração, nas vacas múltiparas do grupo controle de ECC alta, sendo que o desempenho superior para as vacas de melhor condição. Também, na produção de oócitos viáveis por aspiração, ocorreu um melhor desempenho dentro do mesmo grupo controle nas vacas múltiparas, com as doadoras da classe de ECC alta produzindo mais estruturas em comparação com as vacas da classe de escore corporal baixa. Estes resultados estão de acordo com Lopez Ruiz e colaboradores (1996), que também citam que animais com baixa condição corporal apresentam uma redução na produção de oócitos de boa qualidade.

É importante ressaltar que a condição corporal pós-parto é reflexo, do estado nutricional pré-parto, sendo que a função reprodutiva é mais afetada pelos níveis de energia antes do parto do que depois deste (PERRY et al., 1991). E pesquisadores trabalhando com animais *Bos indicus* também verificaram que nesta subespécie, a condição corporal ao parto tem maior influência na duração do anestro pós-parto do que a alimentação no pós-parto (RUAS et al., 2000). Além disso, Ferreira & Torres (1993) observaram que a porcentagem de perda de peso para cessar a atividade ovariana luteal cíclica não depende do peso vivo inicial e sim do ECC. Estes autores afirmaram que a alta correlação entre porcentagem de perda de peso e escore final ( $r = 0,95$ ) mostrou que para animais de condição corporal inferior, uma menor porcentagem de perda de peso é capaz de cessar a atividade ovariana. Da mesma forma, estudos mostraram a associação da nutrição à queda da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causas potenciais o balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela queda no ECC pós-parto (MOREIRA et al., 2000; LOPEZ-GATIUS et al., 2002). Isto permite afirmar que as vacas que parem em pior condição corporal, não teriam como recuperar no início da lactação, o que resultaria sempre em baixo desempenho reprodutivo, de acordo com os resultados deste estudo nas características avaliadas. Segundo Beam & Butler (1997), o atraso na ovulação pós-parto está diretamente associado ao estado energético da vaca, ou seja, quanto maior o BEN, maior o tempo para retorno a ciclicidade, bem como a efeitos adversos na eficiência reprodutiva subsequente da vaca, confirmando que tanto em produção *in vivo* como *in vitro*, a perda da condição corporal compromete o desempenho reprodutivo. Foi observado neste estudo, para primíparas pior desempenho na produção *in vitro*, associado com condição corporal mais baixa no pós-parto.

O número de partições tem influência na duração do período de anestro, sendo que este tende a diminuir com o decorrer das partições durante a vida da vaca, e o intervalo pós-parto geralmente é mais longo em vacas primíparas do que em múltiparas (BELLOWS et al., 1982; YAVAS & WALTON, 2000). Pelo fato das vacas mais jovens ainda apresentarem-se em fase de crescimento após o parto, e

terem maior exigência nutricional, com conseqüente balanço energético negativo mais pronunciado, seria esperado menor desempenho reprodutivo. Nas vacas avaliadas neste experimento, ocorreram diferenças nos intervalos do parto ao primeiro cio, com período maior para as primíparas, no entanto, nos aspectos da produção *in vitro*, com relação à produção de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos por aspiração, não ocorreram diferença entre as doadoras nas ordens de parto estudadas. Adamiack e colaboradores (2005), avaliando novilhas *Bos taurus* cruzadas de Angus x Holandes, concluíram que os efeitos da alimentação na qualidade do oócito são dependentes da ECC inicial da novilha, e que os efeitos da alimentação na qualidade de ovócitos ao longo do tempo são cumulativos. Estes achados confirmaram que o ECC das doadoras no início da lactação possa influenciar seu desempenho reprodutivo nas características avaliadas, conforme os resultados deste estudo.

## 9. CONCLUSÕES

- I. A ablação do folículo dominante pré aspiração folicular produziu maior número de oócitos totais e viáveis, do que sessões de aspirações nos períodos aleatórios da onda folicular, nas vacas Gir primíparas de baixa condição corporal no pós parto.
- II. A ablação do folículo dominante pré aspiração folicular produziu maior número de blastocistos, do que sessões de aspirações nos períodos aleatórios da onda folicular, nas vacas Gir lactantes.
- III. A ablação do folículo dominante pré aspiração folicular favoreceu a conversão de oócitos totais e viáveis em blastocistos nas vacas Gir lactantes.
- IV. Os oócitos aspirados de vacas lactantes da raça Gir, na fase inicial do puerpério, antes de 30 dias do pós-parto, tiveram a mesma competência oocitária e produziram número similar de blastocistos, do que oócitos obtidos em aspirações em períodos mais tardios do pós-parto.
- V. As vacas lactantes da raça Gir produziram maior número de oócitos totais, viáveis e blastocistos em função do escore corporal pós-parto, sendo o número destas estruturas superior para as vacas de melhor condição.

## CAPITULO 3

### **PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E PRENHEZ DE DOADORAS DA RAÇA GIR (*Bos taurus indicus*) SEGUNDO A ÉPOCA DA ASPIRAÇÃO, A IDADE, DNA MITOCONDRIAL DA VACA E O EFEITO DO TOURO.**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é detentor do maior rebanho comercial bovino do mundo. Entretanto, a pecuária nacional ainda encontra-se em desenvolvimento, e o país, apesar de estar entre os maiores produtores mundiais de carne, e possuir potencial para ser grande exportador de leite e derivados, possui baixa taxa de desfrute. Ao analisar o rebanho, de aproximadamente 200 milhões de cabeças, verifica-se por várias razões, tanto estruturais quanto de conjuntura, que o efetivo do rebanho bovino brasileiro está diminuindo. Porém, a demanda por proteína animal crescente torna o aumento de produtividade vital para o setor de bovinocultura e interessante do ponto de vista técnico e econômico. O modelo de criação dominante, as precárias condições de exploração e o baixo nível tecnológico empregado, são os principais motivos da baixa eficiência reprodutiva de nossas matrizes e conseqüentemente, de sua baixa produtividade. Além disso, para o desenvolvimento de estratégias que melhorem o desempenho reprodutivo de raças *Bos indicus* é necessário compreender melhor a fisiologia reprodutiva e suas implicações nos programas de melhoramento animal.

As raças Zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação da pecuária brasileira, representando cerca de 80% do efetivo bovino nacional. A raça Gir exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, sendo ainda eficiente na produção de leite a baixo custo, principalmente quando utilizada em cruzamentos com animais de raças especializadas para a produção leiteira, sendo por isso uma das principais raças Zebuínas utilizadas para esse fim.

A Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) é uma biotécnica de interesse econômico, que aliada à utilização de sêmen sexado possibilita a

obtenção de fêmeas de valor genético superior (GARCIA et al, 2003; BARUSELLI et al., 2006; CAMARGO et al., 2006). O desenvolvimento da metodologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) para maximizar o ganho genético e a produção animal a custo baixo é um desafio de pesquisa científica há vários anos, e a produção em escala comercial de embriões a partir de oócitos puncionados dos folículos ovarianos pode aumentar os benefícios do progresso genético entre gerações e contribuir para os programas de melhoramento genético ou produção animal (RUMPF, 2007).

A tecnologia de transferência de embriões em doadoras Zebuínas leiteiras pelos métodos convencionais através de protocolos de superovulação e coleta de embriões, aplicados após a vaca findar a lactação, não permite a continuidade da vida produtiva da matriz. A transferência de embriões coletados após superovulação tem como limitante o número de embriões produzidos e o número de protocolos aplicados a doadora. A variabilidade da resposta ovariana nos diferentes tratamentos superovulatórios, tais como droga, dosagem, duração e protocolos, interfere nos resultados, assim como fatores inerentes a fisiologia da doadora como: idade, época do ano, estado nutricional e histórico reprodutivo (BO et al., 2002). Em função destas limitações a PIV, incluindo aspiração folicular (OPU), maturação, fertilização, sêmen sexado e cultivo embrionário, é um exemplo de avanço rapidamente incorporado ao setor produtivo, e que resulta em avanços significativos para a pecuária nacional, demonstrando a importância do investimento em pesquisa e desenvolvimento tecnológico nesta biotecnologia (GARCIA et al, 2005; VIANA & CAMARGO, 2007).

O presente trabalho visou identificar os efeitos: da idade e do DNA mitocondrial de doadoras Gir, da época da aspiração (mês e ano) e do touro sobre a produção de oócitos e embriões de PIV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A fazenda experimental Getúlio Vargas em Uberaba MG, possui um dos mais tradicionais rebanhos Gir de aptidão leiteira do país. Fundada em 1948, quando foram adquiridas matrizes de fazendas particulares da região, que com algumas das vacas Gir já existentes na propriedade participaram da formação inicial do rebanho. Nos anos 1952 e 1962, foram adquiridos de diversos criadores novos grupos de vacas. Após essa última aquisição de animais, houve pouco ingresso de fêmeas no rebanho (LEDIC et al., 2004), formando, deste modo, um rebanho com várias origens e com os diferentes tipos de linhagens citoplasmáticas (fêmeas fundadoras do rebanho), cada uma com várias gerações de descendentes.

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos compreende três etapas desenvolvidas no laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos ou criopreservados. A obtenção de oócitos disponíveis para PIV ocorre através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou OPU (ovum pick up), e a OPU tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (BOLS et al., 2004). A PIV mostrou ser uma alternativa à superovulação convencional para a produção de embriões, possibilitando a obtenção de um maior número de gestações de uma doadora em determinado período de tempo (BOUSQUET et al., 1999).

A produção *in vitro* de embriões (PIV), tem sido alvo de muitas pesquisas e estudos com o intuito de melhorar a sua utilização comercial, já que um dos principais problemas atuais da técnica é a variabilidade nos resultados do desenvolvimento *in vitro* dos embriões, uma vez que, em média, apenas 30% dos oócitos maturados se desenvolvem até o estágio de blastocisto, e também 30% dos embriões desenvolvem em gestações a termo (GARCIA et al., 2003). Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos foram realizados visando avaliar individualmente cada uma das três etapas, procurando ajustar da melhor maneira possível, todas as variáveis envolvidas no processo.

A eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está diretamente relacionada à metodologia adequada, sendo que as variáveis técnicas para a obtenção de oócitos possuem considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs), e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento (BOLS et al., 1997). Outro aspecto relevante está relacionado às variações individuais entre doadoras, considerando-se peso, idade, variação, raça, época, entre outros. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são freqüentes. Looney e colaboradores (1994), relataram a possibilidade de aspiração folicular nos animais bastante jovens, e Brogliatti & Adams (1996) obtiveram oócitos de bezerras com apenas seis semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. A origem dos oócitos apresenta um significativo impacto para o seu potencial desenvolvimento. Os animais senis produzem poucos oócitos e com baixo percentual de desenvolvimento, além da baixa qualidade devido ao pequeno número de camadas de células do *cumulus* (GARCIA et al., 1999). Parece haver um consenso quanto à condição corporal, em que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até blastocisto (LOPEZ RUIZ et al., 1996), e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também seriam doadores de oócitos menos competentes (SENEDA et al., 2000).

O envelhecimento reprodutivo manifesta-se de maneira distinta no macho e na fêmea. No macho, está ligado à perda gradual das funções testiculares, já na fêmea, ocorre exaustão completa das células germinativas, perda completa da fertilidade ou diminuição abrupta na circulação dos esteróides gonadais (ADAMS, 1984; PACKER et al., 1998; BROEKMANS et al., 2007). O período pós reprodutivo nas fêmeas, caracterizado pelo tempo entre a última ovulação e a morte, é documentado em humanos, animais selvagens e de laboratório, e representa mais de 25% da vida total do indivíduo (ADAMS, 1984; PIRKE & DOERR, 1973; WAGNER et al., 1991).

Durante a vida embrionária da fêmea, as células germinativas proliferam-se, originando milhões de oócitos. Ao nascimento, ocorre redução drástica do

número dos oócitos e quando a fêmea alcança a puberdade, os ovários possuem menos de 20% dos folículos primordiais presentes ao nascimento. A perda folicular é atribuída a fatores que levam à degeneração dos folículos (MEYERS et al., 1984; PACKER et al., 1998). Durante a vida reprodutiva, o decréscimo exponencial dos oócitos ocorre devido ao processo de recrutamento e atresia folicular presente em cada ciclo estral (WAGNER et al., 1991; PACKER et al., 1998; ESHERE, 2005).

Nos animais domésticos, o declínio da fertilidade é caracterizado por diminuição da taxa de prenhez e do número de filhotes por parto, aparecimento de ciclos longos intercalados com ciclos normais, aumento da ocorrência de mortalidade embrionária, abortos, natimortos, perdas pós-parto decorrentes de má qualidade dos gametas e maior dificuldade uterina em sustentar gestações (PIRK & DOERR, 1973; HEMSELL et al., 1974; HAFEZ, 1995). Em estudo desenvolvido (KRETZER et al. 1995), com cadelas com idades entre 9 e 17 anos, foram observadas patologias uterinas, como hiperplasia endometrial, atrofia e neoplasias uterinas e mamárias em 66% dos animais. As concentrações circulantes de hormônio anti-mülleriano podem ser um indicador mais preciso da idade reprodutiva e da reserva de folículos ovarianos primordiais, em animais assim como em humanos (KEVENAAR et al, 2006; LA MARCA&VOLPE, 2006). Um declínio na contagem de folículos antrais (SCHEFFER et al, 1999), uma resposta ovariana superovulatório reduzida, e menor recuperação de ovulos e consequente produção embrionária, tem sido observada em mulheres mais velhas (KIM, 1995; DEW et al, 1998). Da mesma forma, as vacas mais velhas tendem a ter menos folículos  $\geq 9$  milímetros, após superestimulação ovariana (MALHI et al., 2006). Além disso, Malhi (2005) verificou que mudanças no perfil hormonal e tamanho folicular de fêmeas bovinas idosas foram consistentes às relatadas em mulheres na transição para a menopausa, o que validou a utilização do modelo bovino para estudos referentes à senescência reprodutiva da mulher.

É bem estabelecido que a população de oócitos é fixada durante a fase embrionária e as fêmeas já nascem com um estoque não renovável e, portanto, finito, de folículos (TALBERT, 1977). Com o decorrer da vida reprodutiva, uma

parcela destes folículos será recrutada para crescer, desenvolver, diferenciar e ovular. A maioria dos folículos nunca sofrerá este processo de desenvolvimento e entrariam em atresia (WISE et al., 1997). A viabilidade dos oócitos maduros produzidos durante a fase de maior declínio da fertilidade foi estabelecida em experimentos de transferência de oócitos entre camundongos (TALBERT & KHRON, 1977). O envelhecimento dos oócitos pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, no atraso de sua liberação na ovulação e na demora da penetração pelo espermatozóide (ADAMS, 1984). A causa para a deterioração dos oócitos devido à idade tem sido alvo de debates científicos, apesar do consenso sobre o principal mecanismo envolvido, que é o problema de não disjunção meiótica e o acúmulo de danos no DNA com o avançar da idade (NIKOLAOU & TEMPLETON, 2004). A qualidade oocitária é o fator primário que afeta a performancereprodutiva em éguas velhas e mulheres, apesar das causas associadas a esse processo ainda não estarem bem definidas (CARNEVALE, 2008).

A fertilidade na vaca pode ser alterada por erros de manejo, fatores nutricionais e ambientais. Esses, por sua vez, podem mascarar efeitos da idade (BEARDEN & FUQUAY, 1984; GORDON, 1996). Erickson (1966), ao avaliar ovários de vacas Holandesas retirados cirurgicamente e também coletados em abatedouros, encontrou folículos normais em vacas com idade superior a 10 anos, além da presença de folículos atrésicos predominando em idades avançadas. Exaustão folicular ovariana ocorre entre 15 e 20 anos na vaca, que pode viver além do período pós reprodutivo por seis anos em média (VOM SAAL et al., 1994).

Características endócrinas e reprodutivas de envelhecimento dos ovários, foram caracterizados numa série de recentes estudos em que vacas velhas foram comparadas com as filhas (MALHI et al., 2008). As concentrações circulantes de FSH foram consistentemente mais elevadas em vacas velhas do que nas suas filhas, e o modelo esperado de secreção de FSH e a onda de emergência, o recrutamento, foi mantido em vacas velhas, ou seja, cada onda folicular ovariana foi precedida por uma onda de FSH circulante. Apesar dos elevados valores de

FSH, menos folículos de 4-5 mm foram recrutados em cada onda folicular em vacas velhas quando comparada com a dinâmica das suas filhas. Esta interessante relação inversa entre o número de folículos recrutados em uma onda e as concentrações máximas de FSH também tem sido relatada em estudos que documentam a repetibilidade do número de folículos entre indivíduos. Ciclos com duas ondas de crescimento folicular ocorreram em 60% dos ciclos estrais de vacas velhas e com três padrões de ondas ocorreu no restante, da mesma forma que as suas filhas (MALHI et al., 2008). A maioria dos pares mãe-filha demonstraram a mesma onda padrão, o mesmo comprimento de onda e intervalos, que não se alterou com a idade. O folículo ovulatório de vacas velhas com um padrão de duas ondas foi menor no momento da ovulação do que o das vacas jovens. O diâmetro do CL foi menor, e a concentração plasmática de progesterona, em relação à idade das vacas tendiam a ser mais baixas nas vacas velhas. Não houve efeito da idade sobre as concentrações circulantes de LH ou frequência de pulso. O aparecimento de uma onda adicional durante o ciclo resultou em um maior desgaste no estoque folicular do que em vacas de dois padrões de ondas (MALHI et al., 2008), fornecendo justificativa para a hipótese de que o esgotamento da reserva folicular e início da senescência reprodutiva pode ocorrer mais cedo, em indivíduos que apresentam predominantemente três *versus* dois padrões de ondas. Em um estudo da resposta ovariana ao tratamento superovulação, menos folículos pequenos (<5 mm) foram recrutados para a onda folicular, e menos folículos ovarianos de 6 a 8 mm, de 9 a 11 mm e de 12 milímetros desenvolveram após superovulação em vacas velhas do que na suas filhas jovens. Em média, as vacas jovens tiveram ovulações maiores do que vacas velhas. Alterações de protocolos de superovulação são necessárias em vacas velhas de alto valor zootécnico que permanecem nos programas de transferência de embrião, embora o aumento da dose de FSH eleve a produção de embriões, mas não consegue eliminar efeitos negativos do envelhecimento, como má qualidade dos oócitos (DESAULNIERS et al., 1995).

O início da queda da eficiência reprodutiva é caracterizado por mudanças no perfil hormonal, detectadas por alterações no ciclo estral (SCHINDLER et al.,

1972; VOM SAAL et al., 1994). Altas concentrações de FSH e LH aumentam o estímulo ao desenvolvimento folicular, causando perda acelerada dos folículos (WAGNER et al., 1991; CAETANO et al., 1997; PACKER et al., 1998). Tais mudanças se refletem na baixa qualidade e capacidade dos folículos velhos em produzir concentrações adequadas de inibina, que exerceria efeito de retroalimentação negativa na produção de FSH. O aumento de FSH também é documentado em ratas cíclicas (HADLEY, 1996; PACKER et al., 1998; VOM SAAL et al., 1994). Além da aceleração da folículogênese, acredita-se que o excesso de LH pode ser tóxico aos folículos primordiais e induzir apoptose ou necrose, aumentando a taxa de depleção dos mesmos (FLAWS et al., 1997).

Na vaca, o envelhecimento está associado com a elevação na concentração de gonadotropinas e a redução na concentração dos hormônios esteróides, sendo essas mudanças similares às reportadas durante o início do envelhecimento reprodutivo na mulher. A redução no recrutamento folicular a cada onda emergida indica uma possível redução na resposta ao FSH. Nessa fase, não há registro de aumento na taxa de recrutamento, mas, sim, um desenvolvimento mais lento dos folículos dominante e ovulatório, que atingem sempre um menor diâmetro (MALHI et al., 2005).

Resultados de pesquisa (MALHI et al., 2008), sugerem que a fertilização ou taxas de clivagem diminuem com a idade. Menos embriões, e uma proporção maior de ovócitos infertilizados e zigotos degenerados, foram recuperadas a partir de vacas velhas, em comparação com as suas jovens filhas. Esta conclusão foi corroborada pela observação de que o total de oócitos recuperados por doadora significativamente vacas mais velhas produziram menos de 50% de embriões, comparadas com as suas filhas jovens. A sobrevivência dos embriões obtidos a partir de vacas velhas e suas filhas após a transferência para receptoras jovens não foram diferentes. Portanto, os autores concluíram que, a gravidez, e as perdas de embriões transferidos, não diferiu entre a vaca velha *versus* jovens.

Os principais efeitos da época do ano na produção e desenvolvimento de embriões relacionam-se tanto aos parâmetros climáticos como aos nutricionais. Estes efeitos são especificamente relativos à disponibilidade e qualidade dos

alimentos, ocorrendo principalmente em sistemas de produção onde os animais são manejados a pasto. Zebuínos produzem menos oócitos ou embriões viáveis durante os meses de inverno, já que Tribulo e colaboradores (1991), avaliando doadoras da raça Brahman mantidas a pasto, verificaram maior número de estruturas totais e fecundadas obtidas em coletas realizadas no verão (9,6 e 7,0; respectivamente), quando comparadas com aquelas do inverno (1,6 e 0,8; respectivamente). Em outro trabalho, os autores relataram que vacas da raça Nelore produziram maior proporção de oócitos viáveis na época de verão/primavera, quando comparado com a época de outono/inverno (RUBIN et al., 2005). Além disso, o clima influenciou a superovulação em um trabalho com 40 vacas da raça Gir, no verão e inverno, que resultaram em médias de 3,5 e 2,7 embriões viáveis, respectivamente (MÁRQUEZ et al., 2005). Em contrapartida, em um estudo realizado no Brasil com doadoras da raça Nelore submetidas a bom manejo nutricional, não foi observado efeito da época do ano na coleta de embriões viáveis (média de 11,0 e 9,8 para verão e inverno, respectivamente), nem na taxa de gestação de embriões transferidos para vacas (65,19%) e novilhas (55,97%), respectivamente (SOUZA et al., 2007). Adicionalmente, Lopes (2003), também não observou diferença na produção de estruturas totais e viáveis a partir da superovulação de vacas da raça Gir não lactantes, entre as épocas de inverno e verão, no estado do Rio de Janeiro.

Os efeitos das condições climáticas na eficiência reprodutiva de bovinos refletem-se na taxa de gestação, que sofrem redução nas épocas mais quentes do ano, tanto em condições subtropicais (BADINGA et al., 1985), quanto tropicais (PIRES et al., 2002), devido ao efeito deletério de altas temperaturas ambiente afetarem os índices reprodutivos. O estresse térmico pode reduzir a taxa de fecundação e conversão do oócito em embrião, tanto *in vitro* ou *in vivo* (WOLFENSON et al., 2000; ZERON et al., 2001; AL KATANANI et al., 2002; SARTORI et al., 2002; TORRES JUNIOR 2009). Camargo e colaboradores (2007), trabalhando entre o final da primavera e início do outono nos trópicos, mostraram que oócitos imaturos obtidos a partir de vacas da raça Gir apresentam maior

capacidade de se desenvolver em embriões após maturação e fecundação *in vitro*, em comparação aos oócitos obtidos a partir de vacas da raça Holandesa.

Torres Junior (2009), em um trabalho com vacas da raça Gir (*Bos indicus*), relata que o estresse calórico, produzido de forma artificial e controlado em ambientes de 35°C e 80% de umidade relativa de dia e 30°C e 80% de umidade à noite por períodos de 28 dias, não alterou o percentual de estruturas viáveis aspiradas, embora tenha ocasionado diminuição nas taxas de produção embrionária *in vitro*, e este efeito foi de longo prazo estendendo por 30 a 120 dias. Estes resultados são apoiados pelos relatos de que estresse calórico afeta negativamente algumas funções ovarianas, causando efeitos deletérios estruturais e ou metabólitos nos oócitos, que culminam com a diminuição do potencial de desenvolvimento embrionário (Al-KATANANI et al., 2002; PAULA LOPES et al., 2003, HERNANDEZ-CERON et al., 2004). Rocha e colaboradores (1998), trabalhando com oócitos de vacas Holandesas fertilizados com sêmen de touros Angus no USA, observaram queda da qualidade, na taxa de clivagem e no desenvolvimento de blastocistos *in vitro* durante o verão em relação ao inverno. Embora para doadoras da raça Brahman (*Bos indicus*), estes mesmos autores observaram alta taxa de blastocistos em oócitos coletados e sem diferença para a estação do ano (ROCHA et al., 1998).

O DNA mitocondrial é aproximadamente 17.000 vezes menor que o nuclear e, apesar do pequeno tamanho, é responsável por codificar 13 proteínas (enzimas) essenciais para o processo de geração de energia para as atividades celulares (GIBSON et al., 1997). Tem como peculiaridade a herança exclusivamente materna, não apresentando segregação mendeliana, o que lhe propicia ser foco de muitos estudos filogenéticos. A diferença genética entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, aqueles indivíduos que possuem o cupim no dorso, já foi caracterizado com base nos genomas mitocondrial (DNAm; LOFTUS et al., 1994) e nuclear (MACHUGH et al., 1997). Estes trabalhos mostraram evidências de domesticação independente dos dois grupos genéticos que se divergiram entre 200.000 (dados de DNAm) e 850.000 anos (DNA nuclear) a partir de um ancestral comum. Portanto, claras demonstrações de variantes do DNA

genômico presentes em *Bos indicus*, mas ausentes em *Bos taurus* foram dadas com a caracterização de microsatelites (MACHUGH et al., 1997).

O DNA mitocondrial tem sido estudado na sua provável contribuição na variação das características de crescimento, produção e reprodução. Muitos estudos já foram realizados, obtendo resultados importantes dessa particularidade sobre características ligadas à produção e composição do leite, especificamente, na percentagem de gordura, na concentração de energia e na idade ao primeiro parto (SCHUTZ et al., 1992, 1993; BOETTCHER et al., 1996; HENKES et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009).

Alencar e colaboradores (1993), avaliaram o efeito da linhagem citoplasmática sobre os pesos ao nascimento, a desmama e aos 365 dias de idade de animais da raça Canchim, e constataram efeito significativo da linhagem citoplasmática sobre todas as características. Oliveira (2005), avaliando a influência da linhagem citoplasmática sobre características de comportamento e crescimento na raça Nelore, observou redução nas variâncias aditivas diretas e maternas das características peso a desmama, ganho de peso desmama aos 12 meses, peso ao sobreano, ganho de peso da desmama ao sobreano, perímetro escrotal e temperamento. Contudo, as maiores diferenças entre modelos foram observadas para o peso a desmama e perímetro escrotal, sendo significativas no teste da razão de máxima verossimilhança somente no peso à desmama. As diferenças observadas no peso médio a desmama entre linhagens maternas foram de 22,4 Kg.

Meirelles e colaboradores (1999), por metodologia molecular, analisaram o padrão de DNA mitocondrial nas raças Nelore, Gir e Brahman e observaram, respectivamente, que nos animais puros de origem (PO) 79%, 73% e 100% do DNA mitocondrial era do padrão taurino, enquanto nos puros de origem importada (POI), esses representavam apenas 26%, 25% e 0%, o que, segundo estes autores, confirma a participação de fêmeas *Bos taurus taurus* na formação do Zebu americano. Concluíram, diante desta descoberta, que o Zebu brasileiro é excelente modelo para o estudo da herança citoplasmática, já que permite formar

dois grupos que compartilham elevada percentagem de genes nucleares, mas diferem quanto ao padrão mitocondrial

Os primeiros trabalhos com DNAm, foram realizados por Bel e colaboradores (1985) e Huizinga e colaboradores (1986), em estudos sobre a influência da linhagem citoplasmática em primeiras lactações de vacas Holandesas, relacionada com características de produção e composição do leite. Em outro estudo sobre a influência da herança citoplasmática sobre características de produção e composição do leite, os autores observaram que a linhagem citoplasmática foi fonte de variação significativa, em todos os modelos testados, tanto para percentagem de gordura como para a concentração de energia no leite (SCHUTZ et al.1992). Schutz e colaboradores (1993), avaliando a influência citoplasmática sobre características de produção e composição do leite em vacas Holandesas, sob três diferentes metodologias de classificação molecular das linhagens citoplasmáticas, observaram efeito significativo da linhagem citoplasmática sobre a percentagem de gordura e concentração de energia em duas delas e em uma quanto à produção de gordura. Boettcher e colaboradores (1996), agrupando seus dados aos utilizados por Schutz e colaboradores (1992), encontraram que a linhagem citoplasmática contribui com 2,9% da variação total para percentagem de gordura. Em outro estudo (PELICIONI & QUEIRÓZ, 2001), os autores avaliaram o efeito da linhagem citoplasmática sobre a produção de leite em bovinos da raça Caracu e concluíram que, apesar da ínfima contribuição da linhagem citoplasmática para a variância fenotípica, sua inclusão exercia impacto sobre a variável ambiente permanente.

### 3. OBJETIVOS

Avaliar a influência da idade e do DNA mitocondrial da doadora, da época da aspiração folicular (mês e ano) e do touro utilizado na fertilização *in vitro* sobre o número de oócitos viáveis, embriões produzidos e a taxa de prenhez resultantes da PIV de doadoras da raça Gir do rebanho experimental da EPAMIG.

### 4. HIPÓTESES

O número de oócitos viáveis recuperados, embriões e taxa de prenhez de vacas da raça Gir são menores nos meses da primavera *versus* meses de verão.

O número de oócitos viáveis recuperados, embriões e taxa de prenhez de vacas da raça Gir são diferentes entre meses e ano da aspiração.

Doadoras com DNA mitocondrial *Bos indicus* produzem mais oócitos e embriões e maiores taxas de prenhez que doadoras de DNA mitocondrial *Bos taurus*.

Doadoras Gir com mais de 11 anos de idade apresentam menor quantidade de oócitos a serem aspirados, produzem menos embriões e apresentam menor taxa de fertilidade que doadoras mais jovens.

O número de embriões produzidos e a taxa de prenhez na PIV de doadoras da raça Gir (*Bos taurus indicus*) são influenciados pela resposta individual de touros da raça Gir à técnica de citometria de fluxo, utilizada para separar espermatozóides com cromossomo X.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS TRABALHOS

As aspirações foram realizadas na fazenda Experimental Getúlio Vargas, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, no município de Uberaba/MG, entre outubro de 2007 e abril de 2010. As fertilizações *in vitro* foram realizadas em três laboratórios comerciais da cidade de Uberaba MG. Todas as aspirações foram realizadas pelo mesmo Médico Veterinário enquanto as inovulações foram efetuadas por três profissionais que atuam comercialmente na realização desta biotécnica. Os embriões foram transferidos para receptoras que estavam alojadas na fazenda da Universidade de Uberaba – UNIUBE, no município do Prata MG, distante aproximadamente, 140 km dos laboratórios em Uberaba MG.

### 5.2. ANIMAIS

Foram utilizadas 85 doadoras da raça Gir da Fazenda da EPAMIG que foram submetidas à protocolos de produção *in vitro* com sêmen sexado para cromossomo X de 23 touros da raça Gir. Os touros da raça Gir utilizados foram os positivos no teste de progênie EMBRAPA-ABCGIL.

O grupo de doadoras, pertencente ao núcleo de maior valor genético dentro do rebanho da EPAMIG, continha primíparas e múltiparas, que foram aspiradas em várias etapas de seus ciclos reprodutivos/produtivos (gestantes, vazias, lactantes e secas). Vacas com problemas de infertilidade adquirida após terem no mínimo dois partos normais também foram aspiradas.

Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e ou recrutamento folicular e todas as vacas tiveram o genital feminino avaliado pela ultrassonografia no pós parto e no momento das aspirações foliculares (OPUs).

As doadoras não foram submetidas previamente à aspiração folicular (OPU), qualquer tipo de controle farmacológico do ciclo estral, nem a tratamentos superovulatórios.

Para avaliação da influência da idade nos parâmetros avaliados as doadoras foram divididas em classes de idade (IDC): IDC1 vacas de 2 a 6 anos; IDC2 de 7 a 10 anos; IDC3 acima de 11 anos.

Para avaliação da influência da época da aspiração nos resultados o modelo utilizou os meses e ano das sessões de aspiração.

### **5.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR, MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO***

Os procedimentos de produção *in vitro* de embriões foram realizados por empresas comerciais situadas na cidade de Uberaba MG. No total foram efetuadas 363 aspirações, cujos óocitos, após a maturação, foram fertilizados com sêmen sexado, para cromossomo x, de 23 diferentes touros da raça Gir, embora para análise do efeito do touro foram utilizados apenas os dados de 18 touros, devido ao baixo número de repetições.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom ALOKA SSD 900 (US), com transdutor micro-convexo 5 MHZ, acoplado em uma guia de aspiração transvaginal. As punções foram realizadas com agulha hipodérmica descartável 40 X 9 (20G, Becton Dickson) e sistema de aspiração Handle e Cook. Foi utilizada uma bomba de vácuo e o procedimento foi realizado em todos os folículos acima de 2 mm visualizados em cada ovário. O meio de aspiração e lavagem do sistema foi composto por PBS e heparina sódica. O material aspirado foi encaminhado para a lavagem do líquido e foi utilizado filtro de colheita de embriões. O líquido aspirado foi lavado com o mesmo meio utilizado para a aspiração até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. Osedimento restante foi depositado em placas de Petri para procura e seleção dos oócitos. Posteriormente, foi efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos recuperados em Grau I, II, III, IV e desnudo, segundo De Loos et al. (1991). Os oócitos de GI, GII, GIII, e desnudos foram maturados *in vitro* (MIV) em laboratórios comerciais.

A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, com a utilização de sêmen sexado para cromossomo X de touros da raça Gir.

Os prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento por sete dias. Somente blastocistos entre as fases de inicial até expandidos, foram utilizados para inovulação nas receptoras previamente sincronizadas com a mesma data de aspiração das doadoras.

#### **5.4. INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES**

Para o programa de transferência dos embriões (inovulação) foram utilizadas receptoras mestiças nulíparas e primíparas selecionadas para habilidade materna, que encontravam-se em regime de pastagens, suplementadas com sal mineral, na fazenda da UNIUBE, no município do Prata, MG.

A sincronização das receptoras foi realizada com protocolo básico de utilização de progestágeno de liberação lenta intravaginal ou auricular por nove dias, com aplicação inicial de estrógeno. Com 24 horas antes da aspiração folicular das doadoras, foi efetuada, nas receptoras, a retirada da fonte de progesterona, aplicado eCG, prostaglandina e estrógeno.

Os embriões foram transportados dos laboratórios até a fazenda para inovulação em máquinas próprias para transporte com temperatura controlada de 35,5°C. As inovulações foram realizadas por três técnicos diferentes, com comprovada eficiência e experiência na biotecnologia empregada que atuam comercialmente na região de Uberaba. A transferência dos embriões foi efetuada pelo método não cirúrgico (transcervical) utilizando aplicador universal IMV. As inovulações dos embriões frescos foram realizadas nas receptoras que apresentaram cio entre um dia antes e um depois do cio da doadora, no sétimo dia após o cio, no corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo. O dia do cio da doadora foi considerado como o dia da fertilização *in vitro*.

#### **5.5. CONFIRMAÇÃO DA PREENHEZ E DA PATERNIDADE**

O diagnóstico para confirmação da prenhez foi efetuado aproximadamente aos 28 dias após a inovulação e a sexagem fetal e confirmação da prenhez foram realizadas aos 63 dias por ultrassonografia. Os bezerros resultantes da pesquisa

foram avaliados por cariotipagem sanguínea no momento do nascimento, para confirmação da paternidade.

## 5.6. ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL

A análise do DNA mitocondrial das doadoras foi realizada no laboratório do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo Campus de Pirassununga SP.

O DNA de cada animal foi extraído a partir de sangue periférico coletado em tubos com EDTA. Resumidamente, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise contendo 12 mM de Tris-HCl, pH 8,2; 0,32 M de Sacarose; 5 mM de EDTA e 1% de Triton 100X. Os glóbulos brancos peletizados foram digeridos com proteinase K (0,5 mg/mL) por 3 horas a 55°C. As proteínas foram então precipitadas com solução de NaCl 5 M e o sobrenadante recuperado. Em seguida, o DNA foi precipitado, adicionando-se 3 vezes o volume de etanol absoluto, desidratado e rediluído em água ultrapura (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

A amplificação do DNA mitocondrial foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores direto, de seqüência 5'CCCAACGAGGAAAATATACC 3' e reverso, de seqüência 5'AACCGCAAACAACCTCTTCC 3', sintetizados para amplificar uma região do gene ND5 do genoma mitocondrial entre os nucleotídeos 11770 e 12525 de acordo com Anderson et al. (1982). Finalizando um volume de 50 µL, a reação de PCR foi composta de 100 ng de DNA, solução tampão 1X (estoque 10X: 200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O DNA foi amplificado por 35 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 58°C e 45 segundos a 72°C e então digerido com a enzima de restrição *Hind* III (Invitrogen), submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e os fragmentos originados foram avaliados utilizando o scanner a laser Fuji Film FLA 3000. O mtDNA foi analisado e, de acordo com a presença ou ausência do sítio de restrição da enzima *Hind* III, os indivíduos foram classificados como portadores de

mtDNA *Bos indicus* ou *Bos taurus*. A partir dos resultados para os animais amostrados, a classificação das fêmeas fundadoras foi estabelecida por ascendência. A partir dessas, todos os animais do rebanho foram classificados por descendência, de acordo com sua origem mitocondrial, sendo *Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus*.

## 5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analyses System 2000 (SAS System for Windows). Os dados foram testados quanto a normalidade (anexo) dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Data Analysis. Como não obedeceram as premissas e a normalidade não foi comprovada, empregou-se o procedimento GEMOD de análise de variância não paramétrica. O nível de significância para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 e considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada resposta. Para o nível de significância de 0,05 até 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

Para análise estatística os dados de oócitos viáveis, embriões e prenhez foram analisados pelo programa GENMOD do SAS e considerado, as três classes de idade, a ordem de aspiração, o mês e ano da aspiração, o touro utilizado na fertilização, laboratório da maturação, fertilização e cultivo, e o DNA mitocondrial da doadora.

## 6. RESULTADOS.

As vacas Gir utilizadas no experimento, de aptidão leiteira, variaram da primeira a décima segunda ordem de parto, o desempenho fenotípico do rebanho estudado está representado na tabela 9.

Tabela 9 – Desempenho fenotípico do rebanho Gir utilizado no experimento 2 nas características de produção.

<i>Característica</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>média</i>	<i>S</i>	<i>CV</i>
Produção de leite na lactação (kg)	3.548	6.145	3.640	1225	27,6 %
Duração da lactação (dias)	260	365	299	43	14,7 %
Idade da doadora (anos)	2,3	18,3	8,17	3,32	40,6 %
Ordem de parto (n)	1	12	5,5	3,02	39,6 %

S = desvio-padrão; CV = coeficiente de Variação.

As 363 aspirações das 85 doadoras da raça Gir geraram no total, 6.084 oócitos considerados viáveis, 2.537 embriões, que transferidos, resultaram em 1.105 gestações com uma taxa de fertilidade de 41,70% no dia 30 e 1.002 prenhez resultando em uma taxa de concepção de 39,49% aproximadamente, aos 60 dias após a inovulação.

Na tabela 10 estão apresentados os resultados da PIV obtida das 363 aspirações efetuadas nas 85 doadoras da raça Gir da Fazenda Getúlio Vargas da EPAMIG. O número médio de oócitos viáveis aspirados foi  $16,77 \pm 10,67$  e, o número de embriões por aspiração de  $6,86 \pm 5,32$  e, o número médio das gestações por aspiração de  $3,15 \pm 3,01$  (prenhez). A taxa de conversão de oócito para embrião e de conversão de embrião em prenhez foram de  $41,95 \pm 24,13$  e de  $41,25 \pm 28,29$  respectivamente.

Tabela 10– Número de oócitos viáveis, embriões e prenhez na produção *in vitro* das doadoras Gir (*Bos taurus indicus*) e taxa de conversão com sêmen sexado para cromossomo X de touros da raça Gir. Número mínimo, máximo, médias e desvio padrão e coeficiente de variação

<i>Característica</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>média</i>	<i>CV</i>
Produção de oócitos viáveis/aspiração	1	57	16,77±10,67	63,6 %
Produção de embriões/aspiração	0	32	06,86±05,32	77,5 %
Prenhez por aspiração	0	16	03,15±03,01	95,5 %
Conversão de oócito para embrião (%)	0	100	41,95±24,13	57,5 %
Conversão de embrião em prenhez(%)	0	100	41,25±28,29	68,5 %

CV = coeficiente de Variação.

O número de embriões produzidos mostrou grande variação, com doadoras atingindo até 32 estruturas por aspiração (tabela 10). O número médio de oócitos viáveis aspirados, de  $16,77 \pm 10,67$  (tab. 10) foi diferente entre as vacas provenientes das diferentes classes de idade (tab. 11), sendo registrado que fêmeas de 2 a 6 anos ( $23,80 \pm 1,38$ ) tiveram mais oócitos aspirados que fêmeas de 7 a 10 anos ( $18,87 \pm 1,13$ ) e acima de 11 anos ( $13,98 \pm 1,61$ ), ( $p < 0,05$ ).

O número médio de embriões e prenhez obtidas também foram influenciados pelas classes de idade. Doadoras com 2 a 6 anos de idade ( $9,08 \pm 1,50$ ) produziram mais embriões que fêmeas de 7 a 10 anos ( $7,11 \pm 1,45$ ) e acima de 11 anos ( $4,07 \pm 1,60$ ),  $p < 0,05$ . Já a taxa de prenhez de vacas com até 10 anos foi superior daquelas com mais de 11 anos de idade (tab. 11).

Tabela 11 – Número de oócitos viáveis, embriões e prenhez, de acordo com as classes de idade das doadoras da raça Gir. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias.

<b>Variável</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Embriões</b>	<b>Prenhez</b>	<b>%</b>	<b>n</b>
<b>Classes de idade</b>					
IDC 1	23,80±1,38 a	9,08±1,50 a	4,39±0,85 a	48,3	129
IDC 2	18,87±1,13 b	7,11±1,45 b	3,44±0,82 a	48,3	138
IDC 3	13,98±1,61 c	4,07±1,60 c	1,80±0,90 b	44,2	63

IDC = Classes de idade: IDC 1 vacas de 2 a 6 anos; IDC 2 de 7 a 10 anos; IDC 3 acima de 11 anos. As médias nas colunas com letras diferentes apresentam diferença estatística. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

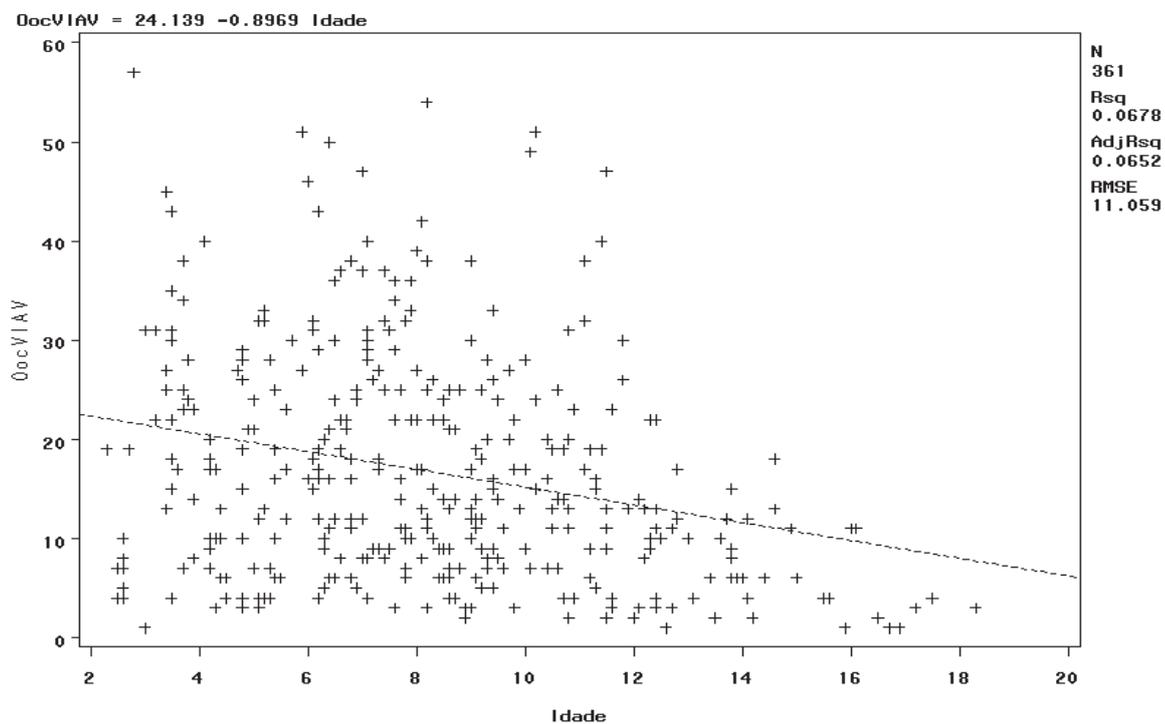


Figura 5 - Regressão do número de oócitos viáveis em relação a idade de vacas da raça Gir (*Bos indicus*).

Na figura 5 é possível verificar que o número de oócitos aspirados variou de acordo com a idade dos animais, sendo registrado que vacas de dois anos de idade produziram em média 24,1 oócitos viáveis e que houve um decréscimo de 0,89 oócitos por ano de vida da doadora.

O número de oócitos viáveis não diferiu entre ordens de aspiração (tab. 12) nem quanto ao ano da aspiração (tab. 13).

Tabela 12 - Efeito da ordem de aspiração folicular sobre o número de embriões por aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias.

Variável	Oócitos viáveis	Embriões	Prenhez	n	Probabilidade
<b>Ordem de aspiração</b>					
Primeira	17,04 $\pm$ 1,33	5,70 $\pm$ 1,34	2,04 $\pm$ 0,75	62	p>0,05
Segunda	16,16 $\pm$ 1,51	5,93 $\pm$ 1,50	3,18 $\pm$ 0,85	57	p>0,05
Terceira	15,69 $\pm$ 1,66	5,22 $\pm$ 1,62	2,60 $\pm$ 0,92	42	p>0,05
Quarta	16,24 $\pm$ 1,88	5,69 $\pm$ 1,77	2,23 $\pm$ 1,00	29	p>0,05
Quinta	18,98 $\pm$ 2,25	6,58 $\pm$ 1,85	3,04 $\pm$ 1,05	23	p>0,05
Sexta	20,00 $\pm$ 2,35	6,54 $\pm$ 1,73	2,55 $\pm$ 0,97	19	p>0,05
Sétima	20,98 $\pm$ 2,70	6,29 $\pm$ 1,97	3,24 $\pm$ 1,11	16	p>0,05
Oitava	22,31 $\pm$ 3,15	9,16 $\pm$ 2,26	4,96 $\pm$ 1,28	10	p>0,05
Nona	22,55 $\pm$ 3,54	9,63 $\pm$ 2,71	5,05 $\pm$ 1,53	7	p>0,05

As médias não diferem nas colunas p>0,05.

Tabela 13 - Efeito do mês e ano da aspiração folicular sobre o número de oócitos viáveis, embriões e prenhez. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias.

Variáveis	Oócitos viáveis	Embriões	Prenhez	n
<b>Mês</b>				
Setembro	24,07 $\pm$ 4,10	15,81 $\pm$ 3,52 a	6,84 $\pm$ 1,99 a	5
Outubro	25,21 $\pm$ 3,18	11,02 $\pm$ 2,95 a	6,06 $\pm$ 1,67 a	10
Novembro	20,38 $\pm$ 1,92	8,59 $\pm$ 1,82 a	3,19 $\pm$ 1,03 b	36
Dezembro	15,43 $\pm$ 2,45	8,12 $\pm$ 2,09 a	3,09 $\pm$ 1,14 b	25
Janeiro	15,74 $\pm$ 1,65	2,74 $\pm$ 2,30 c	1,99 $\pm$ 1,30 b	77
Fevereiro	17,67 $\pm$ 1,66	5,52 $\pm$ 1,87 b	3,29 $\pm$ 1,06 b	67
Março	15,76 $\pm$ 2,12	5,61 $\pm$ 4,36 b	1,38 $\pm$ 2,46 c	3
Abril	15,72 $\pm$ 2,47	5,76 $\pm$ 2,04 b	1,38 $\pm$ 1,15 c	27
Junho	19,98 $\pm$ 3,43	8,81 $\pm$ 3,26 a	4,89 $\pm$ 1,84 b	15
<b>Ano da aspiração</b>				
2007	21,08 $\pm$ 2,84	0,45 $\pm$ 3,13 c	0,41 $\pm$ 1,77	24
2008	19,35 $\pm$ 1,52	4,90 $\pm$ 1,73 b	2,10 $\pm$ 0,98	88
2009	20,02 $\pm$ 1,93	8,74 $\pm$ 2,83 a	4,70 $\pm$ 1,60	29
2010	18,89 $\pm$ 1,69	11,78 $\pm$ 1,64 a	5,60 $\pm$ 0,93	66
2011	15,08 $\pm$ 2,10	7,88 $\pm$ 2,14 a	3,24 $\pm$ 1,21	58

As médias nas colunas com letras distintas apresentam diferença estatística (p<0,05).

O número médio de embriões não diferiu entre a ordem de aspiração (tab. 12), porém foi diferente em relação ao mês e ano que as doadoras foram aspiradas (tab. 13). Maiores produções de embriões foram registradas nos meses de setembro a dezembro e junho e nos anos de 2009 a 2011 ( $p < 0,05$ ).

O número médio de prenhez por aspiração foi de  $3,15 \pm 3,01$  (tab. 13) e foi influenciado pela idade da doadora (tab. 11) e pelo mês da aspiração, sendo os meses de setembro e outubro os que proporcionaram maior número de fêmeas gestantes (tab. 13).

Tabela 14 - Efeito da fertilização *in vitro* de sêmen sexado para cromossoma X, nos touros da raça Gir, sobre o número de embriões, prenhez e taxa de conversão oócito/embrião por aspiração. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias.

Variável	Embriões	Prenhez	Taxa de conversão oócito/embrião %	n
<b>Touro</b>				
Touro 15	$9,82 \pm 2,26$	$5,58 \pm 1,2$ a	$42,08 \pm 10,2$ a	20
Touro 5	$11,59 \pm 2,27$	$5,54 \pm 1,2$ a	$47,37 \pm 10,3$ a	13
Touro 20	$9,64 \pm 3,19$	$5,35 \pm 1,8$ a	$48,97 \pm 14,5$ a	10
Touro 8	$10,51 \pm 2,44$	$4,82 \pm 1,3$ a	$36,37 \pm 11,0$ a	24
Touro 23	$8,71 \pm 2,22$	$4,14 \pm 1,25$ a	$32,77 \pm 10,0$ a	16
Touro 1	$7,46 \pm 3,68$	$3,96 \pm 2,0$ a	$57,12 \pm 16,6$ a	10
Touro 4	$7,19 \pm 1,41$	$3,22 \pm 0,8$ ab	$35,37 \pm 6,4$ a	58
Touro 13	$6,45 \pm 2,24$	$2,86 \pm 1,2$ ab	$33,37 \pm 10,1$ a	22
Touro 14	$4,17 \pm 2,25$	$2,58 \pm 1,2$ ab	$27,09 \pm 10,2$ a	24
Touro 12	$5,57 \pm 2,51$	$2,26 \pm 1,4$ b	$25,85 \pm 11,3$ a	12
Touro 11	$3,59 \pm 2,18$	$0,82 \pm 1,2$ bc	$18,77 \pm 9,8$ ab	20
Touro 21	$2,76 \pm 1,59$	$0,48 \pm 0,9$ c	$5,11 \pm 7,2$ b	33
Touro 22	$0,29 \pm 3,98$	$0,11 \pm 2,25$ c	$2,60 \pm 18,0$ b	3

As médias nas colunas com letras diferentes apresentam diferença estatística. \*As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

O número de embriões produzidos não variou entre os touros utilizados, no entanto, a taxa de prenhez e de conversão de oócito/embrião por aspiração com sêmen sexado foi influenciada pelo touro utilizado na fertilização *in vitro* (tabela 14).

Tabela 15 - Comparação do desempenho na PIV entre as linhagens citoplasmáticas *B. taurus* e *B. Indicus* das doadoras da raça Gir. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

<i>Característica</i>	<i>média</i> ( <i>B.indicus</i> )	<i>média</i> ( <i>B.taurus</i> )	<i>n</i> ( <i>indicus</i> )	<i>n</i> ( <i>taurus</i> )	<i>p</i> *
Oócitos viáveis (n)	16,12 $\pm$ 0,99 b	21,65 $\pm$ 1,37 a	192	138	0,0001
Embriões (n)	6,22 $\pm$ 1,36	7,28 $\pm$ 1,57	155	110	0,2321
Gestações (n)	3,01 $\pm$ 0,77	3,41 $\pm$ 0,89	107	54	0,4311
Conversão de oócito/embrião (%)	34,06 $\pm$ 6,2	28,66 $\pm$ 7,1	155	110	0,1929

\*As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As médias nas linhas com letras diferentes apresentam diferença estatística.

O desempenho na PIV de ambos grupamentos de origem materna, *Bos taurus* ou *Bos indicus*, estão apresentados na tabela 18. Apesar da produção de oócitos viáveis ter sido maior para as fêmeas com DNA mitocondrial *taurus* (21,65  $\pm$  1,37 vs. 16,12  $\pm$  0,99;  $p < 0,0001$ ), a conversão de oócito para embrião, o número de embriões e de gestações não foi influenciado pelo DNA mitocondrial da doadora (tab. 15).

## 7. DISCUSSÃO

A população folicular total presente nos ovários de vacas da raça Gir variam ao longo do ciclo estral, sendo o número máximo de folículos disponíveis observado no quarto dia do ciclo (FERREIRA et al., 2004). O número de folículos presentes nos ovários, apesar de ser influenciado pelo padrão de crescimento e pela regressão dos folículos dominantes, sua principal fonte de variação é o padrão individual de recrutamento folicular, particularmente durante o período correspondente à primeira onda de crescimento folicular (FERREIRA et al., 2004). Silva e colaboradores (2009), avaliando a reserva de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas das raças Nelore e Angus, relataram que embora tenha ocorrido maior rendimento de oócitos nas fêmeas *Bos indicus*, este fato não se deve ao número de folículos pré-antrais, os quais variaram bastante individualmente entre os animais, dentro da mesma categoria, bem como entre raças. Portanto, outros mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular após a fase de pré-antrais, provavelmente são os responsáveis por diferenças entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* no número de oócitos recuperados por aspiração folicular (SILVA et al., 2009). No entanto, a diferença entre doadoras na produção individual de oócitos foi confirmada neste grupo de vacas Gir avaliadas.

Neste trabalho não houve contagem anterior a aspiração dos folículos visualizados, porém ocorreu uma grande variação e diferença entre doadoras quanto ao número de oócitos viáveis recuperados, com os extremos de uma a 57 estruturas. Ireland e colaboradores (2008), utilizando vacas para um estudo da contagem de folículos antrais (AFC), confirmaram a alta repetibilidade (0,85 a 0,95) do número de folículos entre os indivíduos saudáveis por várias ondas consecutivas, independentemente da raça, idade, estação, ou condições de manejo. Ireland e colaboradores (2007) citam que rotineiramente observaram algumas vacas jovens saudáveis pareadas por idade, mostrando apenas oito folículos em crescimento durante ondas foliculares consecutivos de vários ciclos estrais, enquanto outras tinham aproximadamente 56 folículos em crescimento, repetidamente. Além disso, outros pesquisadores também confirmaram estes achados e concluíram que em bovinos podemos fenotipar as doadoras de forma confiável com base na AFC durante uma onda folicular (IRELAND et al., 2008).

A produção de oócitos observada neste trabalho mostrou grande variação entre as

vacas avaliadas, de acordo com a literatura, que cita ocorrências tanto na biotécnica de superovulação e cultivo *in vivo* (TE), quanto na de aspiração folicular e produção *in vitro* (PIV), de uma grande variabilidade na produção de embriões pelas doadoras (SLENNINGL & WHEELER, 1989; GALLI et al., 2003; RUBIN, 2006). Pontes e colaboradores (2009), ao trabalharem em conjunto com TE e PIV, relataram que vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) demonstraram que os procedimentos de PIV resultaram em  $25,6 \pm 15,3$  oócitos viáveis e um maior número de embriões produzidos (média de  $9,4 \pm 5,3$  da PIV *versus*  $6,7 \pm 3,7$  da TE), e a taxa de gestação para os embriões produzidos *in vitro* foi de 33,5% *versus* 41,5% para os *in vivo*. Estes números são superiores aos deste trabalho em relação ao número de estruturas, porém, quanto à taxa de conversão (tab. 10) os resultados foram similares aos da produção *in vivo* destes autores.

No presente experimento, a ordem de aspiração não influenciou o rendimento de oócitos viáveis. Viana e colaboradores (2004), aspirando vacas da raça Gir com cronograma de uma ou duas vezes por semana, não detectou diferenças no rendimento e qualidade de oócitos recuperados nos intervalos de três, quatro ou sete dias. Além disso, o número de folículos aspirados não diferiu entre aspirações 1x ou 2x por semana ( $12,1 \pm 0,6$  *versus*  $11,6 \pm 0,6$ ), embora maior número de oócitos foram recuperados por sessão de aspirações em 1x por semana ( $8,9 \pm 0,8$  *versus*  $7,0 \pm 0,7$ ), resultando em maior taxa de recuperação de oócitos, e que estão abaixo do detectados neste trabalho (tab. 10).

A idade da doadora influenciou significativamente o número de oócitos viáveis neste trabalho. Viana e colaboradores (2004), avaliando fêmeas da raça Gir, embora tenham relatado um número baixo de oócitos viáveis por aspiração, não citaram a idade das doadoras que poderiam ser mais velhas e portanto, terem produzidos um número mais próximo da médias  $13,9 \pm 1,6$  estruturas, ocorridas nas vacas da classe de idade das doadoras acima de 11 anos neste trabalho. Em relação ao número de embriões produzidos, menor e decrescente quando a doadora vai envelhecendo, os resultados obtidos estão de acordo com Garcia e colaboradores (1999), que relataram que vacas senis além de produzirem poucos oócitos teriam baixo percentual de desenvolvimento e baixa qualidade. A qualidade do oócito é importante já que influenciará na fertilização e no subsequente potencial de produzir embriões viáveis, o que é essencial para a prenhez de espécies monovulatórias (WEBB et al., 2007). Malhi e colaboradores (2008), também

encontraram resultados semelhantes, sugerindo uma redução da fertilidade com a idade, visto que vacas velhas produziram menos embriões, e uma proporção maior de ovócitos infertilizados e zigotos degenerados. Estes autores, concluíram que doadoras mais velhas, produziram 50% menos embriões quando comparadas com as suas jovens filhas. Rubim (2005), avaliando 420 vacas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões, com idades variando de 2 a 8 anos (média de 5 anos), que foram submetidas à aspiração sem estímulo hormonal, obteve média de 15,2 oócitos viáveis por aspiração folicular e de 1,5 prenhez por aspiração, com uma eficiência de 29,9% na taxa de conversão. Estes resultados são similares aos das vacas Gir mais velhas utilizadas neste trabalho (tab. 11), e abaixo das vacas adultas e jovens avaliadas, com o qual podemos afirmar que a raça Gir (*Bos indicus*) mostrou ótimos desempenhos nesta biotecnologia (tab. 11). Beltrame e colaboradores (2010), a partir de dados fornecidos pela Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), avaliando o número de embriões viáveis produzidos após fertilização *in vitro* em doadoras da raça Nelore, referente à análise de 20.619 doadoras, 71.602 aspirações e um total de 509.643 embriões, relataram que para a PIV, a média de embriões viáveis por aspiração foi de  $6,43 \pm 5,5$ . Este número médio de embriões produzidos foi semelhante ao encontrado no rebanho da raça Gir avaliado de  $6,06 \pm 5,32$  (tab. 10). Nonato Jr. e colaboradores (2006) compararam quatro protocolos de OPU em vacas Nelore, e relataram que o número de embriões produzidos variou de  $6,1 \pm 1,0$  a  $12,0 \pm 2,6$ , este último com utilização de progestágeno. A média de embriões viáveis obtidos por aspiração neste trabalho com vacas lactantes da raça Gir, de  $6,06 \pm 5,32$  estruturas (tab. 10), encontra-se próxima à relatada na literatura para doadoras *Bos indicus*.

A produção de oócitos por vacas da raça Nelore é, em média de 25 estruturas por aspiração folicular, cerca de quatro vezes superior a de fêmeas *Bos taurus*, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de FSH, BST ou qualquer protocolo de controle do ciclo estral (PONTES, 2009). Estes resultados são similares aos encontrados neste trabalho para as doadoras Gir jovens. No entanto, o maior número de oócitos viáveis detectados neste trabalho foi de 57 estruturas, embora a literatura cite que em doadoras Zebuínas é destaque a alta produção oocitária, com relatos de mais de uma centena de estruturas em uma única aspiração (SENEDA et al., 2010). Cruz e colaboradores (2009),

encontraram taxa média de oócitos aspirados de 4,6 estruturas por sessão em fêmeas bovinas da raça Devon (*Bos taurus*) e 16,3 oócitos na raça nelore (*Bos indicus*). Rubin e colaboradores (2005), avaliando a influência do grau de sangue Zebuino na produção de oócitos revelaram que para os animais da raça Aquitânica (*Bos taurus*), a média foi de 3,7 oócitos por aspiração, para os animais da raça Canchim 13,6 e para as da raça Nelore de 18,4 estruturas. Esses resultados mostram que aumentando a porcentagem de sangue *Bos indicus* na composição racial, há também um aumento na produção de oócitos.

Desta forma podemos afirmar que matrizes Zebuínas da raça Gir também são boas doadoras de oócitos para um programa de PIV, já que existe um consenso de que os animais Zebuinos produzem mais oócitos que as raças taurinas, e este maior número de oócitos refletem em uma maior produção de embriões e prenhez (PONTES et al., 2009). Neste trabalho, o número de embriões produzidos demonstrou grande variação, com 10% das doadoras atingindo mais de 25 estruturas e ocorrendo até 32 embriões em uma única aspiração. Segundo Pontes e colaboradores (2010), estes dados devem ser considerados positivos e tornam viáveis a aplicação comercial em larga escala da técnica de produção, caso, seja realizada uma prévia seleção de doadoras e de touros. A grande contribuição para a produção animal, é que com a utilização da fertilização *in vitro*, maximizou-se a utilização das matrizes geneticamente superiores, podendo-se atingir médias de 25 a 50 bezerros por vaca ano (VARAGO et al., 2008).

No presente trabalho 25% das aspirações resultaram em pelo menos cinco prenhez de fêmeas, com um máximo de 16 gestações em uma única aspiração (tab. 10). Rubin (2006), avaliando o resultado comercial de um grande laboratório com doadoras da raça Nelore, relata a média por aspiração folicular de 15,2 oócitos viáveis, a obtenção de 7.725 embriões e 2.585 prenhez, o que resultou em 1,7 prenhez/aspiração. O resultado médio encontrado neste trabalho, de três prenhez por aspiração, permite validar a utilização desta tecnologia em vacas lactantes da raça Gir destacando o potencial da raça para a PIV.

Silva (2009), em um estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, concluiu que no método de aspiração folicular, fêmeas *Bos indicus* produzem um maior número de oócitos em relação a fêmeas *Bos taurus*, e que uma provável explicação para

esta diferença seria uma maior população folicular para fêmeas *Bos indicus*. Silva (2009), obteve um número médio de oócitos totais e viáveis por procedimento de  $17,1 \pm 4,4$  e  $12,1 \pm 3,8$  para vacas da raça Gir ( $n=3.778$ ), de  $11,4 \pm 3,9$  e  $8,0 \pm 2,6$  para as Holandesa ( $n=1.138$ ), de  $20,4 \pm 5,8$  e  $16,8 \pm 5,0$  para as 3/4 Girolanda ( $n=267$ ), e de  $31,4 \pm 5,6$  e  $24,3 \pm 4,7$  para as 1/2 Girolando ( $n=224$ ), concluindo que fêmeas *Bos indicus* produziram mais oócitos do que fêmeas *taurus*, embora as fêmeas 1/2 sangue (*taurus x indicus*), apresentaram a média mais elevada. Diferenças na produção de embriões entre doadoras tem sido relatados em alguns estudos (MACHADO et al., 2006; DAYAN et al., 2000), e além disso, em vacas Zebuínas patamares de centenas de oócitos tem sido descritos (SILVA, 2009). O fato também foi registrado neste trabalho, com produções extremas de até 57 oócitos viáveis por doadora, embora a taxa de conversão de oócito para embrião tenha variado também em função do touro utilizado, ocorrendo resultados com baixa produção de embriões (tab. 14).

Ferreira e colaboradores (2008), avaliando este mesmo rebanho Gir, relataram que o número de oócitos aspirados foi influenciado pela idade da doadora ( $p < 0,001$ ), ocorrendo uma queda de 1,58 estruturas por ano de idade da vaca, constatando que nas vacas acima de 12 anos, a queda foi mais acentuada, ocorrendo a partir desta idade, aproximadamente a redução média de duas estruturas para cada ano a mais na idade da doadora. Neste experimento, avaliando-se um número maior de doadoras, do mesmo rebanho, as vacas Gir produziram em média 24 oócitos viáveis por aspiração, sendo detectada uma redução de 0,89 oócitos por cada ano de vida da doadora (fig. 5).

Os principais efeitos da época do ano na produção e desenvolvimento de embriões relacionam-se, tanto aos parâmetros climáticos quanto aos nutricionais. Estes efeitos são especificamente quanto à disponibilidade e qualidade dos alimentos, ocorrendo principalmente em sistemas de produção onde os animais são manejados a pasto. A literatura reporta que zebuínos apresentam menor produção de oócitos ou embriões viáveis durante os meses de inverno. Tribulo e colaboradores (1991), avaliando doadoras da raça Brahman mantidas a pasto, verificaram maior número de estruturas totais e fecundadas obtidas em coletas realizadas no verão (9,6 e 7,0; respectivamente), quando comparadas com aquelas do inverno (1,6 e 0,8, respectivamente). Já Rubin e colaboradores (2005), relataram que vacas da raça Nelore produziram maior proporção de

oócitos viáveis na primavera/verão, quando comparado com o outono/inverno. Além disso, a superovulação também mostrou influência da estação climática em um trabalho com 40 vacas da raça Gir, no verão e inverno, que resultaram em médias de 3,5 e 2,7 embriões viáveis, respectivamente (MÁRQUEZ et al., 2005). Por outro lado, Lopes (2003) não observou diferença na produção de estruturas totais e viáveis a partir da superovulação de vacas da raça Gir não lactantes, entre as épocas de inverno e verão. Ressalta-se que os manejos nutricionais foram semelhantes entre as duas estações, bem como não foi observada grande variação na temperatura ambiente, entre as duas épocas estudadas. Souza e colaboradores (2007), também não registraram efeito da época do ano na coleta de embriões viáveis (média de 11,0 e 9,8 para verão e inverno, respectivamente), nem na taxa de gestação de embriões transferidos para vacas (65,19%) e novilhas (55,97%), em doadoras da raça Nelore submetidas a bom manejo nutricional.

Neste estudo foi registrado que não houve influência da época do ano na quantidade de oócitos viáveis aspirados, porém verificou-se que a produção de embriões e prenhez foram influenciadas pela época do ano. Os resultados podem indicar o efeito do clima e/ou da nutrição sobre a taxa de conversão de oócitos a embriões e de sobrevivência embrionária nas receptoras, por razões relacionadas ao próprio embrião de PIV ou às receptoras. Foi identificado que as maiores produções de embriões se deram entre os meses de setembro a dezembro (primavera/verão) e junho (início do inverno), porém os maiores índices de prenhez ocorreram nos meses de setembro e outubro (início da primavera). Considerando que o rebanho de doadoras é suplementado na época da seca (de maio a novembro) com silagem de milho e que, os embriões são gerados de oócitos aspirados cujo desenvolvimento está associado às condições nutricionais bem anteriores a da data de aspiração (mais de 60 dias antes), portanto, pode-se supor que a maior produção embrionária e taxa de prenhez obtida na primavera estejam relacionadas a esta suplementação, que conferiu maior qualidade nutricional às fêmeas. Ressalta-se que nesta época, a temperatura ambiente também era mais amena.

A partir do mês de novembro as doadoras foram manejadas a pasto e já estavam sobre a influência das temperaturas mais altas dos meses de outubro e novembro. Segundo Torres Junior e colaboradores (2007), a exposição prolongada de vacas Gir a estresse térmico, embora não tenha efeito imediato sobre a função reprodutiva, exerce um

efeito retardado e deletério sobre a dinâmica folicular, as concentrações hormonais e competência oocitária. De acordo com os autores, o estresse térmico apesar de não alterar o percentual de estruturas viáveis aspiradas, ocasionou a diminuição nas taxas de produção embrionária *in vitro*, sendo que este efeito foi de longo prazo, estendendo-se por 30 a 120 dias.

Os efeitos das condições climáticas na eficiência reprodutiva de bovinos refletem-se na taxa de gestação, que sofrem redução nas épocas mais quentes do ano, tanto em condições subtropicais (BADINGA et al., 1985), quanto tropicais (PIRES et al., 2002). O estresse térmico pode reduzir a taxa de fecundação e a conversão do oócito em embrião, tanto *in vitro* ou *in vivo* (WOLFENSON et al., 2000; ZERON et al., 2001; AI KATANANI et al., 2002; SARTORI et al., 2002).

Camargo e colaboradores (2007), trabalhando entre o final da primavera e início do outono nos trópicos, mostraram que oócitos imaturos obtidos a partir de vacas da raça Gir apresentam maior capacidade de se desenvolverem em embriões após maturação e fecundação *in vitro*, em comparação aos oócitos obtidos a partir de vacas da raça Holandesa. Estes resultados são apoiados pelos relatos de que o estresse térmico afeta negativamente algumas funções ovarianas, causando efeitos deletérios estruturais e ou metabólitos nos oócitos, que culminam com a diminuição do potencial de desenvolvimento embrionário (AI-KATANANI et al., 2002; PAULA LOPES et al., 2003).

Rocha e colaboradores (1998), trabalhando com oócitos de vacas Holandesas fertilizados com sêmen de touros Angus no EUA, observaram queda da qualidade, na taxa de clivagem e no desenvolvimento de blastocistos *in vitro* durante o verão em relação ao inverno. Embora para doadoras da raça Brahman (*Bos indicus*), estes mesmos autores observaram alta taxa de blastocistos em oócitos coletados e sem diferença para a estação do ano (ROCHA et al., 1998).

Portanto, no nosso trabalho possa ter ocorrido influência do clima e nutrição no desempenho das doadoras, embora ocorram relatos de Alves (2008), de que a época do ano não afetou a produção de embriões de doadoras superovuladas das raças Holandesa e Gir, que recuperaram uma média de estruturas totais, viáveis e congeláveis de, respectivamente, 20,1; 14,6 e 13,3 no inverno e de 8,6; 7,1 e 6,6 no verão ( $p > 0,05$ ) em doadoras da raça Holandesa, e de 2,4; 1,6 e 1,4 no inverno e de 7,7 6,9 e 4,7 no verão

( $p > 0,05$ ), em doadoras da raça Gir.

Relatos sobre a influência nutricional na PIV em bovinos confirmam sua importância nos resultados desta biotecnologia. Martins e colaboradores (2006), avaliando a influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões em vacas Azebuadas, observaram um maior número de folículos  $>3$  mm de diâmetro presentes nos ovários das vacas com alta ingestão no momento das aspirações foliculares, mas o número de ovócitos aspirados e de embriões produzidos *in vitro* não diferiu entre os grupos. Além da quantidade, a composição da dieta consumida antes do acasalamento também afeta a maturação oocitária e a sobrevivência prenatal. Sinais endócrinos e metabólicos que regulam o crescimento folicular podem também influenciar o desenvolvimento do oócito através de mudanças nas concentrações de hormônios e fatores de crescimento no fluido folicular ou via interação células da granulosa e o oócito (WEBB et al., 2004). Mudanças por um curto período no consumo de dietas energéticas influenciam a morfologia do oócito e o potencial de desenvolvimento (O'CALLAGHAN & BOLAND, 1999). Webb e colaboradores (2004), também demonstraram que os ácidos graxos podem talvez influenciar o potencial do desenvolvimento oocitário em vacas de leite de alta produção.

O número médio de oócitos viáveis por aspiração, de  $16,77 \pm 10,66$  foi diferente entre as vacas em função do DNA mitocondrial da doadora, sendo maior nas doadoras de origem *Bos taurus* de  $21,65 \pm 1,37$  oócitos. Para as demais características estudadas como embriões e gestações por aspiração, e a taxa de conversão de oócito para embrião não houve diferença entre as doadoras em função das linhagens citoplasmáticas *B. taurus* e *B. indicus*. Na literatura são poucos os relatos sobre a influência citoplasmática em características relacionadas à eficiência reprodutiva. Contudo, Henkes e colaboradores (2004), avaliaram a influência citoplasmática sobre características reprodutivas na raça Brangus (3/8 Nelore e 5/8 Aberdeen Angus) e observaram que a linhagem citoplasmática contribuiu com 15% da variância fenotípica da idade ao primeiro parto, aproximando-se dos 19% de contribuição do efeito genético direto. A influência dos efeitos genéticos materno não foi observada em qualquer uma das características reprodutivas. Paneto e colaboradores (2008), em um estudo para verificar a existência de diferenças em relação a características produtivas e reprodutivas (produção total de leite na lactação, duração da

lactação, idade ao primeiro parto, e intervalo de partos), entre bovinos da raça Guzerá com aptidão leiteira da origem mitocondrial (*Bos indicus* ou *Bos taurus*), concluíram que elas existiram no rebanho durante a sua formação. Com o passar das gerações, e a manutenção do rebanho sem introdução de novas matrizes, essas diferenças foram diluídas. Seus resultados indicaram que, apesar das diferentes origens estarem relacionadas a diferenças composições genéticas iniciais, as características estudadas não sofreram efeitos significativos do DNA mitocondrial, mas provavelmente apenas de DNA nuclear, uma vez que as diferenças não permaneceram com o passar das gerações. No entanto, Ribeiro e colaboradores (2009), estudando o mesmo rebanho Gir leiteiro do nosso experimento, concluíram que para as características de reprodução, somente encontrou-se influência significativa da origem mitocondrial (*Bos indicus* ou *Bos taurus*) na idade ao primeiro parto, sendo os animais taurinos em média de 30,1 dias mais precoces que os de origem indiana.

Dentro dos fatores importantes que afetam o sucesso da PIV o touro, é responsável por uma grande variação. Há uma série de questões que influenciam as taxas de sucesso do uso de sêmen sexado para a produção *in vitro* de embriões bovinos, que incluem redução nas taxas de fertilização (CRAN et al., 1995), menores taxas de clivagem (LU & SEIDEL, 2004), menor número de blastocistos (MERTON et al., 2007) e baixas taxas de prenhez (CRAN et al., 1995). No entanto, o uso de sêmen sexado é uma potente ferramenta para a produção de embriões do sexo pré-determinado (WHEELER et al., 2006), e a utilização do sêmen sexado em programas de PIV, tem ocasionado grande variação na geração de embriões viáveis a transferência. Estudos recentes comparam a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo ao sêmen convencional (não sexado), em relação à produção *in vitro* de embriões bovinos, e concluem que ambas podem ser utilizadas para PIV obtendo-se índices de clivagem e desenvolvimento embrionário acima de 75% e 35%, respectivamente (LIMA, 2007). Zhang e colaboradores (2003), não observaram diferenças significativas entre as taxas de produção de embriões utilizando sêmen sexado, sêmen submetido somente ao corante para sexagem ou sêmen convencional (20,3%, 21,6% e 22,3% respectivamente), concluindo que a separação dos espermatozoides ou o corante utilizado para a separação por citometria de fluxo não interferem no desenvolvimento embrionário *in vitro*. No entanto, Lu e colaboradores

(1999), encontraram diferenças significativas nas taxas de produção de blastocistos utilizando sêmen sexado ou convencional, mas afirmam que a utilização desta biotécnica é viável para programas de PIV. No nosso trabalho, todas as fertilizações foram realizadas com uso de sêmen comercial de touros da raça Gir sexado para cromossoma X no citômetro de fluxo. Com os resultados da taxa de conversão de oócito em embrião de 41,7%, nos permite validar o uso desta tecnologia na PIV com a raça estudada. No entanto, ficou demonstrada a diferença entre touros, com os resultados mostrando conversão atingida por vários touros acima da média relatada na literatura para sexagem realizada no citômetro. Palma & Sinomatz (2004), realizaram um estudo no qual utilizaram na PIV, sêmen de 63 touros que na IA haviam apresentado taxas de prenhez aos 60 e 90 dias de 65 a 75% e observaram taxas de blastocistos variando de 6,9 a 51,2 %, sendo observadas variações significativas. Neste trabalho, também ocorreu uma grande variação entre touros nos resultados com sêmen sexado para cromossoma X. A utilização de sêmen sexado, embora melhore a relação custo-benefício na transferência de embriões, por ser uma técnica invasiva, pode em algumas vezes, inviabilizar a utilização de determinado embrião ou promover injúrias a sua integridade ocasionando reduções nas taxas de gestação (WILSON et al., 2006). No entanto, Beltrame e colaboradores (2010), avaliando indicadores de eficiência reprodutiva e custo da prenhez na eficiência econômica da produção *in vivo* e de embriões, afirmaram que a sexagem fetal deve estar associada à produção *in vivo* de embriões bovinos.

## 8. CONCLUSÕES

A produção de oócitos viáveis e embriões por aspiração, foi associada com a idade da doadora, ocorrendo uma queda na produção das estruturas com o avançar da idade.

A produção de embriões foi influenciada pelo mês e ano das aspirações.

O número de prenhez por aspiração, foi diferente em função do mês da aspiração folicular e do touro utilizado na fertilização *in vitro*.

A produção de oócitos viáveis foi influenciada pela linhagem citoplasmática da doadora, sendo menor nas vacas de DNA mitocondrial *Bos indicus*.

A conversão de oócitos em embriões e a taxa de prenhez de aspirações em doadoras da raça Gir (*Bos taurus indicus*), são influenciadas pelo sêmen sexado para cromossoma X de touros da raça Gir.

## 9. REFERÊNCIAS

ACOSTA, B., TARNAVSKY, G.K., PLATT, T.E., HAMERNIK, D.L., BROWN, J.L., SCHOENEMANN, H.M., REEVES, J.J. Nursing enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. **Journal Animal Science**. v. 57, p.1530-1536, 1983.

ADAMIAK, S.J., MACKIE, K., WATT, R.G., WEBB, R., SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality; cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology Reproduction**. v. 73, p. 918-926, 2005.

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.177-88, 1992.

ADAMS, C. E. Reproductive senescence In: AUSTIN, C.R., SHORT, C.R. **Reproduction in Mammals**. 2. ed London. Cambridge University Press 315 p (Book 4 reproductive fitness), 1984.

ADAMS, G. P., EVANS, A.C.O., RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8 months old prepubertal heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v. 100, p. 27, 1994.

AERTS, J.M.J, OSTE, M., BOLS, P.E.J. Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guided biopsy collection of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. xx, p. xx, 2005.

AHMAD, N., SCHRICK, F.N., BUTCHER, R.L., INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology Reproduction**. v. 52, p. 1129-35, 1995.

ALENCAR, M. M., LIMA, R., BARBOSA, P. F. Herança citoplasmática de pesos de bovinos Canchim. **Rev. Bras. Genet.**, v.16, n.3, p.390, 1993.

AL-KATANANI, Y. M., PAULALOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal Dairy Science**., v. 85, p. 390-396, 2002.

ALMEIDA, E.F.L., PIRES, J.A.A. A utilização da vaca F1: visão da EMATER – MG. In: Encontro de Produtores de Gado Leiteiro F1, 5, 2004. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2004, p. 169-184.

ALVES, B.R.C. **Produção *in vitro* e transferência de embriões F1 em rebanhos leiteiros, utilizando o cruzamento recíproco entre as raças Holandesa e Gir, em duas épocas do ano**. 2008. 90f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte MG.

ANUALPEC 2010. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2010.

ARMSTRONG, D.G. GONG, J.G., WEBB, R. interactions between nutrition and ovarian activity in cattle, physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction Domestic Ruminants**. V.61, p.371-378, 2003.

ARMSTRONG, D.G., MCEVOY, T.G., BAXTER, G., ROBINSON, J.J., HOGG, C.O., WOAD, K.J., WEBB, R., SINCLAIR, K.D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology Reproduction**. v. 64, p. 1624-1632, 2001.

ARREGUIN, J. A. A.; SANTOS, R. E.; VILLA-GODOY, A.; ROMÁN-PONCE, H. Dinámica folicular ovárica en vacas Cebú con diferente condición corporal y frecuencia de amamantamiento durante el periodo anovulatorio posparto. In: **Curso Internacional de Reproducción Bovina 7.**, México, **Anais...** 1997. p. 210–240, 1997.

AYRES, H. Efeito da espessura da gordura subcutânea, da condição e do peso corporal durante o pré e pós-parto na atividade ovariana após o parto e na eficiência reprodutiva de vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. **Dissertação** de Mestrado.

AYRES, H., PENTEADO, L.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; FERREIRA, R.M.; BARUSELLI, P.S. Escore de condição corporal e espessura da gordura subcutânea como preditores de ciclicidade em vacas Nelore (*Bos indicus*) no período pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. s1051, 2007.

BACELAR, D., MAX, M.C., LUCIANA C. PADILHA, L.C., BARREIROS, T.R., SENEDA, M.M. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Ciências Agrárias**, v. 31, p.161-172, 2010.

BADINGA, L., COLLIER, R. J., THATCHER, W. W. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in sub-tropical environment. **Journal Dairy Science**., v. 68, p. 78- 85, 1985.

BAGNATO, A., OLTENACU, P.A. Phenotypic evaluation of fertility traits and their association with milk production of Italian Friesian cattle. **Journal Dairy Science**. v. 77, p. 874–882, 1994.

BALLARD C.B, LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., PRYOR, J.H., LYNN, J.W., BONDIOLI, K.R., GODKE, R.A. Comparing lipid content and total circulating cholesterol and triglyceride levels of *Bos taurus* and *Bos indicus* oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**.v. 20, p. 177, 2008.

BARB, C.R. The Brain-Pituitary-Adipocyte Axis: Role of Leptin in Modulating Neuroendocrine Function. **Journal Animal Science**. v. 77, p. 1249–1257, 1999.

BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em Zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.19, n. 1-2 p.9-12, 1995.

BARTLETT, P.C., KIRK, J., COE, P.; MARTENIUK, J., MATHER, B.C. Descriptive epidemiology of anestrus in Michigan holstein-friesian cattle. **Theriogenology**. v. 27, p. 31, 1987.

BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**. v. 82–83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S., SÁ FILHO, M. F., MARTINS, C. M., NASSER, L. F., NOGUEIRA, M. F. G., BARROS, C. M., BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BASSO, A.C., SCHNEIDER, C.L., PONTES, J.H.F. Novas alternativas para a aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2010, Londrina, PR. Os melhores Pesquisadores nacionais e Internacionais gerando soluções para a pecuária Brasileira: **Anais...Londrina, PR: UEL, 2010. 209p.**

BASTOS, M.R., MARTINS, A.C., MELO, L.F., CARRIJO, L.H.D., RUMPF, R., SARTOR, I R. Efeito da condição corporal e da ingestão alimentar sobre a resposta superovulatória e produção embrionária em novilhas nelore. **Acta Science Veterinary**. v 35 (supl), 2007a.

BASTOS, M.R., RAMOS, A.F., DRIESSEN, K., MARTINS, A.C., RUMPF, R., SARTORI, R. Efeito do *flushing* nutricional sobre a resposta superovulatória em vacas mestiças. **Acta Science Veterinary**. v 35 (supl), 2007b.

BEAM, S.W., BUTLER, W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology Reproduction**. v. 56, p. 133–142, 1997.

BEAM S. W., BUTLER W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **Journal Reproduction Fertility**. Supplement. 4, p.411-424, 1999.

BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. Physiological and psychological causes for reproductive failure. In: Bearden, H.J., Fuquay, J.W. (Ed.). **Applied Animal Reproduction**. 2.ed. New Jersey: Prentice-hall, 1984. p.331-365.

BELL, B. R., MCDANIEL, B.T., ROBISON, O.W. Effects of cytoplasmic inheritance on production traits of dairy cattle. **Journal Dairy Science**. v. 68, p. 20-38, 1985.

BELLOWS, R.A., SHORT, R.E. Effects of precalving feed level on birth weight, calving difficulty and subsequent fertility. **Journal Animal Science**. v. 46, p. 1522-1528, 1978.

BELLOWS, R.A., SHORT, R.E., RICHARDSON, G.V. Effects of sire, age of dam and gestation feed level on dystocia and postpartum reproduction. **Journal Animal Science**. v. 55, p. 1827, 1982.

BELTRAME, R.T., QUIRINO, C.R., BARIONI, L.G., DÍAS, A.J.B., SOUZA, P.M. Análise da produção de embriões na fertilização *in vitro* e transferência de embriões para doadoras Nelore. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 1, p. 17-23, jan./mar. 2010.

BERGFELT, D.R., BO, G.A., MAPLETOFT, R.J., ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrus cycle in cattle. **Journal Reproduction Science**. v. 49, n.1, p. 1-12, 1997.

BERGFELT, D.R., LIGHTFOOT, K.C., ADAMS, G.P. ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n.6, p.895-907, 1994.

BETTS, B.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p.171-191, 2001.

BLOCK, S.S., BUTLER, W.R., EHRHARDT, R.A., BELL, A.W., VAN AMBURGH, M.E., BOISCLAIR, Y.R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. **Journal of Endocrinology**. v. 171, n. 2, p. 339-48, 2001.

BO, G. A., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A., TRIBULO, H. E., CACCIA, M., MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without progestogen implant. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, n. 8, p. 1555–1569, 1994.

BO, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRÍBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, n.1 p.53-72, 2002.

BO, G. A., COLAZO, M. G., MARTÍNEZ, M. F., KASTELIC, J. P., MAPLETOFT, R. J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes ésteres de estradiol. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Ed. UEL, 2006. p. 71-84.

BOETTCHER, P. J., STEVERINK, D.W.B., BEITZ, D.C. Multiple herd evaluation of the effects of maternal lineage on yield traits of Holstein cattle. **Journal Dairy Science**, v.79, n.4, p. 665-662, 1996.

BOETTCHER, P.J., KUHN, M.T., FREEMAN, A.E. Impacts of cytoplasmic inheritance on genetic evaluations. **Journal Dairy Science**, v.79, p.663-675, 1996.

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

BOLS, P.E.J., YSEBAERT, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., KRUIF, A., Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-995, 1998.

BOLS, P.E.J., LEROY, J.L.M.R., VANHOLDER, T., VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906-914, 2004.

BONCZEK, R.R., YOUNG, C.W., WHEATON, J.E., MILLER, K.P. Responses of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yields in Holsteins. **Journal Dairy Science**. v. 71, p.2470-2479, 1988.

BONI, R., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C., KOGUT, J., KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.

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

BROEKMANS, F.J., KNAUFF, E.A.H., TE VELDE, E.R., MACKLON, N.S., FAUSER, B.C. Female reproductive ageing current knowledge and future trends. **Endocrinology and Metabolism**, v 18, n.2, p. 58-65, 2007.

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

BURATINI, J.JR., VISINTIN, J.A., BO, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, n.3 p.421-431, 2000.

BURATINI, J.JR., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., GLAPINSKI, V.F., PINTO, M.G.L., GIOMETTI, I.C., BARROS, C.M., CAO, M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**. v.130, p. 343-50., 2005.

BURNES, P.D., SPITZER, J.C., HENRICKS, D.M. Effect of dietary energy restriction on follicular development and luteal function in nonlactating beef cows. **Journal Animal Science**. v.75, p.1078-1086, 1997.

BUTLER W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p.449-457, 2000.

BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**. v. 83, p. 211–218, 2003.

BUTLER, W.R., EVERETT, R.W., COPPOCK, C.E. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cow. **Journal Animal Science**. v.53, p. 742-748, 1981.

BUTLER, W.R., SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function. **Journal Dairy Science** v.72, p. 767-783, 1989.

BYERLEY, D.J., WHISNANT, C.S., DEAN, R., KISER, T.E. Hypothalamic Proopiomelanocortin mRNA levels in suckled or nonsuckled beef cows: a preliminary study. **Theriogenology**. v. 40, p. 661-668, 1993.

CAETANO, J. P. J., FARIA, M. M. L., LIMA, R. S. B. C. **Ginecologia e obstetrícia: manual prático**. TEGO. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997, 726 p.

CAMARGO, L. S. A., VIANA, J.H.M., SÁ, W. F. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 19-28, 2006.

CAMARGO, L. S. A., VIANA, J. H. M., RAMOS, A. A. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626-632, 2007.

CANFIELD, R. W., BUTLER, W. R.; Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, n.3, p. 323-330, 1990a.

CANFIELD, R.W., SNIFFEN, C.J., BUTLER, W.R. Effects of degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.73, n. 9, p. 2343-2349, 1990b.

CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, n.1, p. 23-30, 2008.

CAROLAN, C., LONERGAN P., MONGET P., MONNIAUX D., MERMILLOD P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v. 43, p. 477-483, 1996.

CARRUTHERS, T.D., CONVEY, E.M., KESNER, J.S., HAFS, H.D., CHENG, K.W. 1 The hypothalamo-pituitary gonadotrophic axis of suckled and nonsuckled dairy cows postpartum. **Journal Animal Science**. v. 51, p. 949-957, 1980.

CASTILHO, C., ASSIS, G. S., GARCIA, J. M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 288-294, 2007.

CAVALIERI, J., FARIN, P. W., KINDER, J. E., VAN CAMP, S. D., WHITACRE, M. D., WASHBURN, S. P., BRITT, J. H. Ovarian follicular development following administration of progesterone or aspiration of ovarian follicles in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 805-821, 2001.

CERRI, R.L.; RUTIGLIANO, H.M.; CHEBEL, R.C. et al. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.137, p.813-823, 2009a.

CERRI, R.L.A., JUCHEM, S.O., CHEBEL, R.C. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1520-1531, 2009b.

CHAUBAL, S.A., MOLINA, J.A., OHLRICH, C.L.B FERRE, L.B FABER D.C., BOLS, P.E.J., RIESEN, J.W., TIAN, X., YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v.65, n.8, p. 1631-1648, 2006.

CHAUBAL, S.A., FERRE, L.B., MOLINA, J.A., FABER D.C., BOLS, P.E.J., REZAMAND, P., TIAN, X., YANG, X. Hormonal treatments for increasing the

oocyte and embryo production using OPU-IVP system. **Theriogenology**, v.67, p. 719-728, 2007.

CLARKE, I.J., POMPOLO, S. Synthesis and secretion of GnRH. **Animal Reproduction Science**. v. 88, p. 29-55, 2005.

CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, v.136, p. 495-496, 1995.

CRUZ, F.B., MARTINS, L.T., MARINHO, L.S.R., FORELL, F., VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A. aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 8, n.2, p.184-187, 2009.

CUNNINGHAM, M.J., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology Reproduction**. v. 60, n. 2, p. 216-22, 1999.

CUSTER, E.E., BERARDINELLI, J.G., SHORT, R.E., WEHRMAN, M.E., ADAIR, R., Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first calf suckled beef heifers exposed to mature bulls **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 1370-7, 1990.

DAYAN, A., WATANABE, M. R., WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. V. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.

DEJARNETTE, J.M., DAY, M.L., HOUSE, R.B., WALLACE, R.A., MARSHALL, C.E. Effect of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronization of estrus using GnRH and PGF<sub>2</sub>α. **Journal Animal Science**. v. 79, p. 1675-1682, 2001.

DELAVAUD, C., FERLAY, A., FAULCONNIER, Y., BOCQUIER, F., KANN, G., CHILLIARD, Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal Animal Science**. v. 80, p. 1317-1328, 2002.

DELL'AQUA JR., J. A., PAPA, F. O., ARAÚJO JR., J. P., FREITAS, C. P., PONCHIROLLI, C. B. ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 205-212, 2006.

DEMARQUE, K.C., RODRIGUES, C.F.M., NOGUEIRA, L.A.G., PINHO, T.G., TORTELLY, R. Histologic changes in ovaries of cows submitted to repeated follicular punctures. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 315, 2003.

DESAULNIERS, D.M., LUSSIER, J.G., GOFF, A.K., BOUSQUET, D., GUILBAULT, L.A. Follicular development and reproductive endocrinology during a synchronized estrous cycle in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.117-131, 1995.

DEW, J.E., DON, R.A., HUGHES, G.J., JOHNSON, T.C., STEIGRAD, S.J. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. **Journal Assistent Reproduction Genetics**. v. 15,p. 210–214, 1998.

DIAS, F.M.G.N. **Efeito da condição corporal, razão peso/altura e peso vivo sobre o desempenho reprodutivo pós parto de vacas de corte Zebuínas**. Belo Horizonte MG, 1991. 100p, Dissertação (mestrado) Escola de Veterinária-Universidade Federal de Minas Gerais, belo Horizonte.

DOMECQ, J. J., SKIDMORE, A. L., LLOYD; J. W., KANEENE, J. B. Validation of Body Condition Scores with Ultrasound Measurements of Subcutaneous Fat of Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 2308-2313, 1995.

DOMINGUEZ, M. M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1405-1418, 1995.

DUNN, T. G., KALTENBACH, C. C. Nutrition and the postpartum interval of the ewe, sow and cow. **Journal Animal Science**, v. 51, supl. 2, p. 29–37, 1980.

DUNNE, L.D., DISKIN, M.G., BOLAND, M.P., O'FARRELL, K.J., SREENAN, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. **Animal Science**. v. 69, p. 411-17, 1999.

DUNNE, L. D., DISKIN, M. G., SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 39-44, 2000.

DZIUK, P.J., BELLOWS, R.A. Management of reproduction in beef cattle, sheep and pigs. **Journal Animal Science**, v. 57, supl. 2 p. 355–362, 1983.

ECHTERNKAMP, S.E., FERRELL, C.L., RONE, J.D. Influence of pre-and postpartum nutrition on LH secretion in suckled postpartum beef heifers. **Theriogenology**. v.18, p. 283-295, 1982.

EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 68-78, 1989.

EL, A., ZAIN, D., NAKAO, T., RAOUF, M.A., MORIYOSH, M., KAWATA, K., MORITSU, Y. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**. v. 38, p. 203-214, 1995.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

ESHHERE Capri Workshop Group. Fertility and ageing. **Human Reproduction Update**, v. 11, n.3, p. 261-276, 2005.

EVANS, A. C., ADAMS, O.G.P., N. C. RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 463, 1994.

EVANS, A. C., IRELAND, J. L., WINN, M. E., LONERGAN, P., SMITH, G. W., COUSSENS, P. M., IRELAND, J. J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **Biology Reproduction**., v. 70, p. 1475–1484, 2004.

FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. **Canine and felíne endocrínology and reproduction**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 785 p. 1996.

FERGUSON, J. D., GALLIGAN, D. T., THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v.77, p. 2695-2703, 1994.

FERGUSON, J.D. 1991. Nutrition and reproduction in dairy cows. *In: The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Praticce-Dairy Nutrition Management*, 7 (2): 483-507.

FERNANDEZ, D.L., BERARDINELLI, J.G., SHORT, R.E., ADAIR, R. Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. **Journal Animal Science**. v. 74, p.1098-1103, 1996.

FERREIRA, A.M., TORRES, C.A.A. et al. Perda de peso corporal e cessação da atividade luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., v.28, n.3, p. 411-418, 1993.

FERREIRA, M.B.D., DANTAS, M.S., RIBEIRO FILHO, A.L. Efeito da categoria animal sobre o desempenho reprodutivo de vacas azebuadas em programa de inseminação artificial. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG., XIV, 1994, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte** : EV-UFMG, 1994, v.1,p.92.

FERREIRA, M.B.D. LOPES, B. C., DANTAS, M. MOURÃO, G.B., VALE FILHO, V. R.; Escore do aparelho reprodutivo pré estação de monta em novilhas Zebu aos dois anos. **Rev. Brás. de Reprod. Animal**. V.23, N.1,P.111, 1999.

FERREIRA, M.B.D. LOPES, B.C., FERREIRA, J.J. Sustentabilidade do sistema de produção de leite com animais F1: perspectivas e pesquisa In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA Jr., E.V.(Org.). **Produção de Leite e Sociedade**: FEPMVZ, Belo Horizonte, 2001, p.383-404.

FERREIRA, A.M, VIANA, J.H.M, CAMARGO, L.S.A., SÁ, W.F., PEREIRA, P.A.C. População Folicular Ovariana Durante o Ciclo Estral em Vacas da Raça Gir. **Revista Brasileira Zootecnia**. v.33, n.6, Supl. 1, p.1689-1694, 2004.

FERREIRA, M.B.D., LOPES, B.C, AZEVEDO, N.A., LEDIC, I.L., Escore corporal e manejo reprodutivo de vacas Gir leiteiro. **Revista Gir Leiteiro**. n.5, p. 46-54, 2005a.

FERREIRA, M.B.D., LOPES, B.C., FERNANDES, L.O, et al. Efeito da condição corporal pré-parto no anestro lactacional de vacas Gir leiteiro. **Anais**, X Congresso Brasileiro de Zebuínos, v.1, p.205, 2005b.

FERREIRA, M.B.D., LOPES, B.C., SOUZA, J.C., AZEVEDO, N.A., FERNANDES, L.O., RIBEIRO, S.A., ROCHA, A.A. Dinâmica ovariana pós parto e ciclo curto no puerpério de múltíparas *Bos indicus* da raça Gir leiteira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais...** Belo Horizonte, MG, CBRA 2007, disponível em [www: cbra.org.br/publicações](http://www.cbra.org.br/publicações). Resumo.

FERREIRA, M.B.D.F., LOPES, B.C., PANETO, J.C.C., RIBEIRO, S.A., FERNANDES, L.O., BOEIRA, D.R., CUNHA, F.V., TETZNER, T.A.D., GARCIA, J.M. Parâmetros reprodutivos de doadoras *Bos indicus* da raça Gir leiteiro na produção *in vitro* de embriões no programa MOET da EPAMIG-UNIUBE. In: 8º Congresso Brasileiro de Zebu., Uberaba, MG. **Anais...Uberaba ABCZ**, 2008.

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.

FINCH, C. E. Reproductive senescence in rodents factors in decline of fertility and loss of regular estrous cycles. In: **Aging Reproductive System**. New York Raven Press, p.193-212, 1978.

FLAWS, J. A., ABBUD, R., MANN, R. J., NILSON, J. H., HIRSHFIELD, A. N. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biology Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1233-1237,1997.

FORCADA, F., ABECIA, J.A., CASAO, A., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., MUINO-BLANCO, T., PALACIN, I. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in ewes during anestrus and the reproductive season. **Theriogenology**, v. 67, p. 855-862, 2007.

FREITAS, C, FERREIRA, A.M., SÁ, L.S.A et al. Desempenho de vacas gir na resposta superovulatória e produção de embriões . **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 25, n. 1 (suppl), p. 232-233, 1997.

FRERET, S., GRIMARD, B., PONTER, A.A., JOLY, C., PONSART, C., HUMBLLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances *in vitro* embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**. v. 131, p. 783-94, 2006.

FRÜHBECK G. A heliocentric view of leptin. **Proceedings Nutrition Society**. v. 60, n. 3, p. 301-18, 2001.

GALINA, C.S., CALDERON, A., McCLOSKEY, M. Detection of signs of estrus in the Charolais cow and its Brahman cross under continuous observation. **Theriogenology**, v.17, n.5, p.485-498, 1982.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part. 4. Oestrus cycles. **Animal Breeding Abstracts**, v.58, n.8, p.697-707, 1990.

GALINA, C.S., ORIHUELA, A, RUBIO, I. **Behavioral characteristics of Zebu cattle with emphasis on Reproductive Efficiency**. In: FIELDS, J.F & SAND, R.S. (ed) Factors affecting calf crop, p. 345-361, 1994.

GALINA, C.S., ORIHUELA, A., RUBIO, I. Reproductive Physiology in Zebu cattle, characteristics related to estrous expression and performance of bulls utilized in natural mating. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. 1995. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: 1995, p.46-61.

GALINA, C.S., ORIHUELA, A., RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1, p.465-470, 1996.

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

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GALLO, L., CARNIER, P., CASSANDRO, M., et al. Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. **Journal Dairy Science**, v..9, n. 1009–1015, 1996.

GAMBINI, A.L.G., MOREIRA, M.B.P., CASTILHO, C., BARROS, E.C.M. Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 22, n. 4, p. 201-210, 1998.

GARCIA, J.M, ESPER, C.R., AVELINO, K.B., PUELKER, R.Z., VANTINI, R., ALMEIDA Jr., I., RODRIGUES, C.F.M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, n.1,p. 237, 1999. (Abstract).

GARCIA, J. M., YAMAZAKI, W., AVELINO, K.B. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 60-64, 2003.

GARCIA, J.M., AVELINO, K.B., VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2005, Londrina, PR. Biotecnologia da reprodução em bovinos: **anais...**Londrina, PR: UEL, 2005. 201p.

GEARHART, M. A., CURTIS, C. R., ERB, H. N., SMITH, R. D., C. J. SNIFFEN,, CHASE, L. E., Cooper; M. D. Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. **Journal Dairy Science**, v. 73, p. 3132–3140, 1990.

GIBBONS, J.R., BEAL, W.F., KRISHER, R.J., FABER, F.G, PEARSON, R.F., GWAZDAUSKAS, F.C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.

GIBSON, J.P., FREEMAN, A.E., BOETTCHER, P.J. Cytoplasmic and mitochondrial inheritance of economic traits in cattle. **Livestock Production Science**, v.47, p.115-124, 1997.

GILLUND, P., REKSEN, O., GRÖHN, Y. T., KARLBERG, K. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 390-396, 2001.

GINTHER O.J., KNOPF L., KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.223-30, 1989.

GINTHER, O. J., KNOPF, L., J. P. KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-30, 1991.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p.60-61, 2000.

GOMES, S.T. O diagnóstico da pecuária leiteira de Minas Gerais em 2005, relatório de pesquisa. Belo Horizonte, **FAEMG**, 2006.156 p. 2006.

GONG, J.G., MCBRIDE, D., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I, and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal Endocrinology**. v. 139, p. 67-75, 1993.

GONG, J.G., MCBRIDE, D., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I, and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Journal Endocrinology**. v. 143, p. 157-164, 1994.

GONG, J.G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**.v. 23, p.229–241, 2002a.

GONG, J.G., LEE,W.J., GARNSWORTHY, P.C.,WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**. v. 123, p. 419–427, 2002b.

GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

GORDON, I. Controlled reproduction in cattle and buffaloes. Wallingford: Cab international, 1996

GORE, A.C., YEUNG, G., MORRISON, J.H., OUNG, T. Neuroendocrine aging in the female rat: the changing relationship of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and N-methyl-D-aspartate receptors. **Endocrinology**, v 141, n. 12, p.4757-4768, 2007.

GUTIERREZ, C.G., CAMPBELL, B.K., WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology Reproduction**. v. 56, p. 608-616, 1997.

HADLEY, M. E. **Endocrinology**. 4 ed Tucson Prentice-Hall, 1996, 518 p.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo. Manole, 582 p. 1995.

HAGEMANN, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v.51, p.449-459, 1999.

HANSEN, K.R., THYER, A. C., SLUSS, P.M., BREMNER, W. J., SOULES, M.R.,

KLEIN, N.A. Reproductive aging and ovarian function is the early follicular phase FSH rise necessary to maintain adequate secretory function in older ovulatory women. **Human Reproduction**, v 20, n.1, p 89-95, 2005.

HARRISON, R.O., FORD, S.P., YOUNG, J.W., CONLEY, A.J., FREEMAN, A.E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal Dairy Science** v. 73, p. 2749-58, 1990.

HAYAKAWA, H., HIRAI, T., TAKIMOTO, A., IDETA, A., AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, v.71, p. 68-73, 2009.

HAYFLYCK, L. Biology of ageing: a review. **Australian Journal Ageing**, v.17, 1, p. 29-32, 1998.

HEMSELL, D. L., GRODIN, J. M., BRENNER, P. F., SIITERI, P.K., MACDONALD, P. C. Plasma precursors of estrogens. II- Correlation of the extend of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 38, n 1, p 476-479, 1974.

HENDRIKSEN, P.J.M., STEENWENG, W.N.M., HARKEMA, .J.C., MERTON, J.S., BEVERS, M.M., VOS, P.L.A.M., DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.61, p. 909-920, 2004.

HENDRIKSEN, P.J.M., VOS, P.L.A.M., STEENWENG, W.N.M., BEVERS, M.M., DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p. 11-20, 2000.

HENKES, L. E., BENAVIDES, M. V., OLIVEIRA, J. F. C. Maternal inheritance on reproductive traits in Brangus-Ibagé cattle. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1163-1167, 2004.

HILL, B.R., KUEHNER, L.F. Bovine donor blood cholesterol, embryo color and embryo freezability. **Theriogenology**. v.49, p. 168, 1988.

HOLINKA, C.H., FINCH, C.E. Age-related changes in the decidual responses of the C57BL/6J mouse uterus. **Biology Reproduction**, v 16, p.385-393, 1977.

HOLNESS, D.H., HOPLEY, J.D.H., HALE, D.H. The effects of plane of nutrition, live weight, temporary weaning and breed on the occurrence of oestrus in beef cows during the postpartum period. **Animal Production**. v. 26, p. 47-54, 1978.

HOUGHTON, P. L., LEMENAGER, R. P., MOSS, G. E., HENDRIX, K. S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio

and visual body condition score. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 1429–1437, 1990.

HUIZINGA, H. A., KORVER, S., MC DANIEL, B. T. Maternal effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproduction traits. **Livestock Production Science**. V.15, n. 1, p. 11-26, 1986.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

IRELAND, J.J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction** v. 22, p. 1687–1695, 2007.

IRELAND, J.L.H., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., THEMME, A.P.N., WARD, F., LONERGAN, P., SMITH, G.W., PEREZ, G.I., EVANS, A.C.O., IRELAND, J.J. Antral follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. **Biology Reproduction**, v. 79, p. 1219–1225, 2008.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**. v.78, p. 185–201, 2004.

JUENGEL, J.L., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., SMITH, P., READER, K.L., LAWRENCE, S.B., O'CONNELL, A.R., LAITINEN, M.P., CRANFIELD, M., GROOME, N.P., RITVOS, O., MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology Reproduction**. v. 68, p.1777-89, 2002..

KEVENAAR, M.E., MEERASAHIB, M.F., KRAMER, P., VAN DE LANG-BORN, B.M., DE JONG, F.H., GROOME, N.P., THEMME, A.P., VISSER, J.A. Serum anti-Mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, v. 147, p. 3228–3234, 2006.

KIM, S.H. Female aging and superovulation induction for IVF. **Journal Obstetrics Gynaecology**. 21, 75–82, 1995.

KING, R.S., ANDERSON, S.H., KILLIAN, G.J. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. **Journal Andrology**. v. 15, p. 468-78, 1994.

KNIGHT, P. G., AND GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science** v. 78, p.165–183, 2003.

KNOPF, L., KASTELIC, J.P., SCHALLENBERGER, E., GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**. v.6, p. 111-9, 1989.

LA MARCA, A., VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? **Clinic Endocrinology**. v. 64,p. 603–610, 2006

LALMAN, D.L., KEISLER, D.H., WILLIAMS, J.E., SCHOLLJEGERDES, E.J., MALLETT, D.M. Influence of postpartum weight and body condition change on duration of anestrus by undernourished suckled beef heifers. **Journal Animal Science**. v.75, p. 2003-2008, 1997.

LAMB, G.C., LYNCH, J.M., GRIEGER, D.M., MINTON, J.E., STEVENSON, J.S. Ad libitum suckling by an unrelated calf in the presence or absence of a cow's own calf prolongs postpartum anovulation. **Journal Animal Science**. v. 75, p. 2762-2769, 1997.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J., GIANGRECO, M., MELÉNDEZ, P., BARTOLOMÉ, J., BENNET, F., RAE, D.O., HERNÁNDEZ, J., ARCHBALD, L.F. Effect of biostimulation on uterine involution, early ovarian activity and first postpartum estrous cycle in beef cows. **Theriogenology**. v. 61, p. 1521-1532, 2004.

LASSEN, J., HANSEN, M., SORENSEN, M. K., AAMAND, G. P., CHRISTENSEN, L. G., MADSEN, P. Genetic analysis of body condition score in first-parity Danish Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 4123–4128, 2003.

LEDIC, I.L., FERNANDES, L.O., VERNEQUE, R.S. **O Gir leiteiro da Fazenda Experimental Getúlio Vargas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2004. 28p. (Série Documentos, 40).

LEDIC, I.L., FERNANDES, A.R., TETZNER, T.A.D. El Gyr Lechero en el mundo tropical. In: CONGRESO NACIONAL DE LA CADENA LÁCTEA, 1er., Guatemala, 2006. **Anais...** Guatemala: Cámara de Productores de Leche y Comisión de la Leche, 2006. 24 p. (Disponível em: <<http://www.lecheros.org/new/info-banner.html>>).

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., NORTHEY, D.L., FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 376-383, 1987.

LEIVAS, F.G., BRUM, D.S., RUFINO, F.A., GUIMARÃES, A.V., BERNARD, M.L., SILVA, C.M., RUBIN, M.I.B. Response of the *Bos indicus* cow to aspiration per OPU session and *in vitro* produced blastocyst. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 411, 2003.

LEROY, J.L., GOOSSENS L., GELDHOF A., VANHOLDER T., OPSOMER G., VAN SOOM A., DE KRUIF, A. Embryo quality and color in Holstein Friesian and Belgian Blue cattle in relation to donor blood cholesterol and triglycerides. **Reproduction Fertility and Development**. v.16, p. 211, 2004.

LEROY, J.L., OPSOMER G., DE VliegHER S., VANHOLDER T., GOOSSENS L., GELDHOF A., BOLS P.E., DE KRUIF A., VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**. v.64, p. 2022-2036, 2005.

LIMA, V.F.M.H. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozóides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira Zootecnia.**, v.36, *suplemento especial*, p.219-228, 2007.

LOFTUS, R. T., MACHUGHL,D.E., NGERE,L.O., BUN, D.S., BAD, A.M. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. **Animal Genetics**. v.25, p. 265-271, 1994.

LONERGAN P., MONAGHAN P.; RIZOS D., BOLAND M.P., GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

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

LOPES, B. C. **Comportamento sexual e concentração de progesterona de fêmeas Zebuínas (*Bos taurus indicus*) em diferentes estações climáticas após: I – Luteólise natural ou induzida, e II – superovulação.** 2003. 237 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOPEZ RUIZ, L., ALVAREZ, N., NUNEZ, I., MONTES, I., SOLANO, R., FUENTES, D., PEDROSO, R., PALMA, G.A., BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 292, 1996. (Abstract).

LÓPEZ-GATIUS, F., YA´ NIZ, J., MADRILES-HELM, D. Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 59, p. 801–812, 2003.

LÓPEZ-GATIUS, F., SANTOLARIA, P., YANIZ, J. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, v.57, p.1251-1261, 2002.

LOTTHAMMER, K. H., Influence of nutrition on reproductive performance of the milking/gestating cow in the tropics. In: SPEEDY, A.; SANSDUCY, P. (Ed.) **Feeding Dairy Cows in the Tropics**. Roma: FAO, 1991. p. 36-47.

LOZANO, J.M., LONERGAN, P., BOLAND, M.P., O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**. v. 125, p. 543-53, 2003.

LU, K.H., CRAN, D.G., SEIDEL Jr., G.E. *In vitro* fertilization with flow cytometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1393-1405, 1999.

LU, K.H., SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT, M., WOLF, E., GONCALVES, P.B. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**. v. 65, p. 573–83, 2006.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPERT, M., MATOS, L.F., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. Variability in ovum pick up and *in vitro* embryo production results of monozygotic twin cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 443, 2003. (Abstract).

MACHATKOVÁ M., JOKESOVÁ E., PETELÍKOVÁ J., DVORÁČEK V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801-810, 1996.

MACHATKOVÁ M., KRAUSOVA K., JOKESOVÁ E., TOMANEK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and phase follicular wave on embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329-335, 2004.

MACHUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**. v. 146, p. 1071-1086, 1997.

MAHLI, P.S., ADAMS, G.P., SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging In women follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology Reproduction**, v 73, p 45-53, 2005.

MALHI, P.S., ADAMS, G.P., PIERSON, R.A., SINGH, J. Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, p. 66, p. 1257–1266, 2006.

MALHI, P.S., ADAMS, G.P., MAPLETOFF, R.J., SINGH, J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1-4, p. 100-109, 2008.

MALVEN, P.V., PARFET, J.R., GREGG, D.W., ALLRICH, R.D., MOSS, G.E. Relationship among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone releasing hormone in neural tissue of beef cows following early weaning. **Journal Animal Science**. v.40, p.723-733, 1986.

MANN, G.E., LAMMING GE, ROBINSON RS, WATHES DC. The regulation of interferon-t production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal Reproduction Fertility**. v. 54 (supl.), p. 317-28, 1998.

MANNIKKO, M., TORMALA, R.M., TUURI, T., HALTIA, A., MARTIKAINEN, H., ALA-KOKKO, L., TAPANAINEN, J.S., LAKKAKORPI, J.T. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. **Human Reproduction**. v. 20(6), p.1578-85, 2005.

MARLOWE, T. J., FREUND, R. J., GRAHAM, J. B. Influence of age, breed, flesh condition, nursing, and season on weight and grade of beef cattle. **Journal Animal Science**, v.21, p.346–354, 1962.

MÁRQUEZ, Y. C., GALINA, C. S., MORENO, N. T. I. Seasonal effect on Zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. **Reproduction Domestic Animal**, v. 40, p. 553-558, 2005.

MARTINS, A.C. **Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões e função ovariana em *Bos indicus***. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

MARTINS, A.C., MOLLO, M.R., BASTOS, M.R., GUARDIEIRO, M.M., SARTORI, R. Concentrações séricas de hormônios reprodutivos e metabólicos em vacas azebuadas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Science Veterinary**, v. 35(supl), 2007.

MARTINS, A.C., RAMOS, A.F., MOLLO, M.R., PIVATO, I., CAMARA, J.U., CARRIJO, L.H.D., DRIESSEN, K., RUMPF, R., SARTORI, R. Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Acta Science Veterinary**. v. 34 (supl), p. 290, 2006.

MEINTJES, M., BELLOW, M.S., BROUSSARD, J.R., PAUL, J.B., GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for *in vitro* fertilization. **Journal Animal Science**, v.73, p.967-974, 1995.

MEIRELLES, F.V., ROSA, A.J.M., LÔBO, R.B. Is the american Zebu really *Bos indicus*? **Genetic Molecular Biology**. v.22, n.4, p. 543-546, 1999.

MELDRUM, C.R. Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. **Fertility and Sterility**, v 59, n 1, p 1-5,1993.

MELO, D.S. **Produção *in vitro* de embriões derivados de oócitos obtidos de diferentes fases da onda folicular de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2008. 88f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu SP.

MERTON, J.S., HARING, R.M., STAP, J., HOEBE, R.A., ATEN, J.A. Effect of flow cytometrically sorted frozen thawed semen on success rates of *in vitro* bovine embryo production. **Theriogenology**, v. 47, p.295, 2007.

MERTON, J.S, ASK, B., ONKUNDI, D.C., MULLAART, E., COLENBRANDER, B., NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pickup *in vitro* production embryo production program. **Theriogenology**, v. 72, p. 885-893, 2009.

MERTON, J.S., ROOS, A.P.W., MULLAART, E., RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P.L.A.M, DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MEYERS, R. K., COOK, J. E., MOSIER, J.E. Comparative aging changes in uterine tubes (oviducts) electron microscopy. **American Journal Veterinary Research**. . v.45, n. 10, p. 2008-14, 1984.

MIHM, M., AND BLEACH, E. C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science** v. 78, p. 217–237, 2003.

MIHM, M., BAKER, P. J., IRELAND, J. L., SMITH, G. W., COUSSENS, P. M., EVANS, A. C., AND IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology Reproduction**., v. 74, p.1051–1059, 2006.

MOLLO, M.R., RUMPF, R., MARTINS, A.C., CARRIJO, L.H.D., SAUERESSIG, M.G., SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Science Veterinary**. v 35 (supl), 2007.

MONTIEL, F., AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: A review. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.1–26, 2005.

MOREIRA, F., RISCO, C., PIRES, M.F. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, v.53, p.1305-1319, 2000.

MORENO, D., CUTAIA, L., VILLATA, M. L., ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 408, 2001.

MORO, J., CASTAÑEDA, O. G., RUIZ, F., ROMÁN, H. Aplicación de un sistema de registro de la producción en ganaderías de doble propósito. In: REUNIÓN CIENTÍFICA DEL SECTOR AGROPECUARIO Y FORESTAL DEL ESTADO DE VERACRUZ, 7., 1994, Veracruz, México. **Anais...** 1994.

MORRISON, D.G., SPITZER, J.C., PERKINS, J.L. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beef cows calving in moderate body condition. **Journal Animal Science**. v.77, p. 1048-1054, 1999.

MOSS, G.E., PARFET, J.R., MARVIN, C.A., ALLRICH, R.D., DIEKMAN, M.A. Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. **Journal Animal Science**. v.60, p. 285-293, 1985.

MUKASA-MUGERMA , E. A. Review of reproductive performance of female *Bos indicus* (Zebu) cattle. **ILCA Monografic**. v.6, p.1-34, 1989.

MURPHY, M. G., BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal Reproduction Fertility**, v.90, p.523–533, 1990.

MYERS, T.R., MYERS, D.A., GREGG, D.W., MOSS, G.E. Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**. v.6, p. 183-190, 1989.

NICHOLS, S.M., BAVISTER, B.D., BRENNER, C.A., DIDIER, P.J., HARRISON, R.M., KUBISCH, H.M. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Human Reproduction**, v 20, n. 1, p 79-83, 2005.

NIESCHLAG, E., BEHRE, H. M. **Andrology: male reproductive health and dysfunction**. 2. ed. Berlim: Springer, 454 p. 2001.

NIKOLAOU, D., TEMPLETON, A. Early ovarian aging. **Europeu Journal Obstetricy Ginecology Reproduction Biology**. v.113, p.123-133, 2004.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular Celular Endocrinology**. v.175, p. 123-30, 2001.

NILSSON, E., KEZELE, P., SKINNER, M.K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular Cellular Endocrinology**. v. 188, p. 65-73, 2002.

NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI, JR.J., PRICE, C.A., CASTILHO, A.C.S., PINTO, M.G.L., BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH *in vitro*. **Molecular Reproduction Developmen**. v. 74, p. 680-86, 2007.

NOLAN, R., O'CALLAGHAN, D., DUBY, R.T., LONERGAN, P., BOLAND, M.P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology**. v. 50, p. 1263-1274, 1998.

NONATO JÚNIOR, I., RUFINO, F. A., SANCHES, B. V., PONTES, J. H. F., UVO, S., SERENO JÚNIOR, J. C., SENEDA, M. M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2004, v. 32, p. 95.

NONATO JR. I., PONTES, J. H. F., ERENO JR., J. C., GIMENES, L. U. G.; TORRES JR., J. R. S., BARUSELLI, P. S. Utilização de progesterona exógena em protocolos de OPU de vacas Nelore: resultados preliminares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, Supl.1, p. 452, 2006.

O'CALLANGAN,D., BOLAND, M.P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 299-314, 1999.

ODELL, W. O. **The menopause and hormonal replacement**. In: DeGROOT, L. J. Endocrinology. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995 v. 3, p 2128-2139, 1995.

OLIVEIRA, P.Q. **Análise genética dos efeitos de linhagem materna em um rebanho Nelore**. 2005, 57f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

OYEDIPE, E.O., PATHIRAJA, N., VOH Jr, A.A. et al. Use of plasma progesterone profiles for the assessment of reproductive functions in indigenoius Nigerian zebu cattle. **Theriogenology**, Los altos, v. 30, n. 3, p. 629-41, 1988.

PACKER, C., TATAR, M., COLLINS, A. Reproductive cessation in female mammals. **Nature**, v. 392, n 6678, p 807-811,1998.

PALMA, G.A., SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of embryos. **Anatomy, Histology and Embriology**. v. 33, p. 257'262, 2004.

PANETO, J.C.C., FERRAZ, J.B.S., BALIEIRO, J.C.C., BITTAR, J.F.F., FERREIRA, M.B.D., LEITE, M.B., G.K.F. MERIGHE, F.V. MEIRELLES. *Bos indicus* or *Bos taurus* mitochondrial DNA - comparison of productive and reproductive breeding values in a Guzerat dairy herd. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 592-602, 2008.

PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**. v.140, p.4262-71, 1999.

PAULA-LOPES, F.F., CHASE, C.C.J., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**. v. 125, p. 285–94, 2003..

PAVLOK A., LUCANS-HAHN, NIEMANN H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction Development**, v.31, p. 63-67, 1992.

PELICIONI, L. C., QUEIRÓZ, S. A. Efeito da linhagem citoplasmática sobre a produção de leite em bovinos da raça Caracu. **Revista Brasileira Zootecnia.**, v.30, n.1, p. 109-114, 2001.

PERRY, R. C., CORAH, L. R., COCHRAN, R. C., BEAL, W. E., STEVENSON, J. S., MINTON, J. E., SIMMS, D. D., BRETHOUR, J. R. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotrophins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. **Journal Animal Science**, v. 69, p. 3762-3773, 1991.

PETYIM, S., BAGE, R., HALLAP, T., BERGQVIST, A.S., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. **Theriogenology**, v. 60, p. 175-188, 2003.

PIERSON R.A., GINTHER O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.21, n.3, p.495-504, 1984.

PIERSON R.A., GINTHER O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37,1988.

PIETERSE, M. C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 01, p. 19-24, 1991.

PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. **Theriogenology**, v. 37, p. 273, 1992. (Abstract).

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81,1998.

PIRES, M. F. A., FERREIRA, A. M., SATURNINO, H. M. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandês confinadas em free-stall, no verão e no inverno. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia.**, v. 54, p.57-63, 2002.

PIRKE, D. M., DOERR, P. Age related changes in interrelationships between plasma testosterone, oestradiol and testosterone binding globulin in normal adult males. **Acta Endocrinologica**, v 74, n. 4, p 792-800,1973.

PONTES, J.H.F., NONATO JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n.4, p. 690-697, 2009.

PORETSKY, L., CATALDO, N.A., ROSENWAKS, Z., GIUDICE, L.C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocrinology Review**. v. 20, p. 535-582,1999.

PRYCE, J. E., COFFEY, M. P., SIMM, G. The relationship between body condition score and reproductive performance. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 1509-1515, 2001.

RAE, D. O., KUNKLE, W .E., CHENOWETH, P. J., SAND, R. S., TRAN, T. Body condition: influences on beef cattle reproductive performance. In: CONGRESO NACIONAL DE BUIATRIA, 10. Acapulco, Gro., México. **Anais...** 1996, p. 339-343, 1996.

RANDEL, R.D. Endocrine aspects of the zebu cow. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento n.1, p.1-26, 1989.

RANDEL, R.D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **Journal Animal Science.**, v. 68, p. 853-862,1990.

REKWOT, P.I., OGWU, D., OYEDIPE, E.O. Influence of bull biostimulation, season and parity on resumption of ovarian activity of Zebu (*Bos indicus*) cattle following parturition. **Animal Reproduction Science**. v. 63, p. 1-11, 2000.

REVAH, I., BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal Reproduction Fertility**. . v. 106, p. 39-47, 1996.

RHODES, F.M., FITZPATRICK, L.A., ENTWISTLE, K.W., DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, n.1, p.41-49, 1995a.

RHODES, F. M., G. DE'ATH AND K. W. ENTWISTLE. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 265, 1995b.

RHODES, F. M., MCDOUGALL, S., BURKE, C. R., VERKERK, G. A., MACMILLAN, K. L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 1876-1894, 2003.

RHODES, J. M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995b.

RIBEIRO, S.H.A., PEREIRA, J.C.C., VERNEQUE, R.S., SILVA, M.A., BERGMANN, J.A.G., LEDIC, I.L., MORAIS, O.R. Efeitos da origem e da linhagem do DNA mitocondrial sobre características produtivas e reprodutivas de bovinos leiteiros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**., v.61, n.1, p.232-242, 2009.

RICHARDS, M. W., SPITZER, J. C., WARNER, M. B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **Journal Animal Science**. v. 62, p. 300–306, 1986.

RIVERA, G. M., AND FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v. 144, p. 437–446, 2003.

ROBERSON, M.S., WOLFE, M.W., STUMPF, T.T., KITOK, R.J., KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology Reproduction**. v. 41, p. 997-1003, 1989.

ROBERTS, A.J., NUGENT III, R.A., KLINDT, J., JENKINS, T.G. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and

resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. **Journal Animal Science**. v. 75, p. 1909-1917, 1997.

ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**. v. 49, p. 657-65, 1998.

ROCHE, J.F., MACKEY, D., DISKIN, M.D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science** v. 60-6, p. 703-712, 2000.

ROCHE, J. R., DILLON, P. G., STOCKDALE, C. R., BAUMGARD, L. H., VANBAALE, M. J. Relationships among international body condition scoring systems. **Journal Dairy Science**, v.87, p.3076-3079, 2004.

ROOVER, de R., GENICOT, G., LEONARD, S., BOLS, P., DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. . **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 13-25, 2005.

RUAS, J.R.M., NETO, A.M., AMARAL, R. Considerações sobre o manejo no pré e pós-parto de vacas de corte e seus reflexos sobre a eficiência reprodutiva. **Informe Agropecuário**. v. 21, n. 205, p. 70-75, 2000.

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

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

RUBIN, K. C. P., MAX, M. C., PONTES, J. H, F. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça nelore. **Acta Science Veterinary**., v. 33, p. 372, 2005 (resumo).

RUEGG, P.L., MILTON, R.L. Body condition score of holstein cow on Prince Edward Island, Canada: Relationships with yield, reproductive performance, and diseases. **Journal Dairy Science** v.78, p. 552-564, 1995.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira Zootecnia**., v.36, sup. Esp., p.229-233, 2007.

RUND, L.A., LESHIN, L.S., THOMPSON, F.N., RAMPACEK, G.B., KISER, T.E. Influence of the ovary and suckling on luteinizing hormone response to nalaxone in postpartum beef cows. **Journal Animal Science**. v. 67, p. 1527-1531, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SANGSRITAVONG, S., COMBS, D.K., SARTORI, R., ARMENTANO, L.E., WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. **Journal Dairy Science** v.85, p. 2831-42, 2002.

SANTOS, J. E.P., THATCHER, W. W., CHEBEL, R. C., CERRI, R. L. A., GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 513-535, 2004.

SANTOS, J.E.P., AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**. v. 26, n. 1, p. 19-89, 1998.

SANTOS, J.E.P., CERRI, R.L.A., BALLOU, M.A., HIGGINBOTHAM, G.E., KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**. v.80, p. 31-45, 2004.

SANTOS, R.M. **Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio**. 2005, 78f. Tese (Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP).

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

SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R., MERTENS, S. A. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SAVIO, J. D., KEENAN, L., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. Patter of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SCHALLENBERGER, E., PETERSON, A.J. Effect of ovariectomy on tonic gonadotrophin secretion in cyclic and post-partum dairy cows. **Journal of Reproduction Fertility**. v. 64, p. 47-52, 1982.

SCHEFFER, G.J., BROEKMANS, F.J., DORLAND, M., HABBEMA, J.D., LOOMAN, C.W., TE VELDE, E.R. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. **Fertil. Steril.** v.72, p. 845–851, 1999.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 1271-1282, 1992.

SCHINDLER, A. E., EBERT, A., FRIEDRICH, E. Conversion of androstenedione to estrone by human tissue. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v 35, n,4, p. 627-630,1972.

SCHUTZ, M. M., FREEMAN, A. E., BEITZ, D. C. The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.75, n.5, p. 1331-1341, 1992.

SCHUTZ, M.M., FREEMAN, A. E., LINDERG, G. L. Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. **Journal Dairy Science**, v. 76, n.2, p. 621-629, 1993.

SELK, G.E., WETTEMANN, R.P., LUSBY, K.S., OLTJEN, J.W., MOBLEY, S.L., RASBY, R.J., GARMENDIA, J.C. Relationship among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. **Journal Animal Science**. v.66, p.3153-3159, 1988.

SENATORE, E.M.; BUTTLER, W.R.; OLTENACU, P.A. Relationship between energy balance and postpartum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. **Journal Animal Science**. v.62, p. 17-23, 1996.

SENEDA, M.M. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. 4º Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada. Os melhores Pesquisadores Nacionais e Internacionais gerando soluções para a pecuária Brasileira.Londrina PR. **Anais...** p. 14-22, 2010.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M, VANTINI, R. Relação entre tamanho do folículo e aspiração folicular transvaginal para o desenvolvimento *in vitro* de embriões. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS.**, v.27, n.1,p. 293, 1999.

SENEDA, M.M., ESPER C.R., GARCIA, J.M. VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. Abstracts of 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, **Anais...**v.01, p.62, 2000 (Abstract).

SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., OLIVEIRA, J. A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., ANDRADE, E.R., GARCIA, J.M., OLIVEIRA, J.A. Shorter interval between fsh administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery, **Theriogenology**, v. 57, p. 684, 2002. (Abstract).

SENEDA, M. M., ESPER, C. R., ANDRADE, E. R., BINELLI, M., OLIVEIRA, J. A., MAX, M. C., GARCIA, J. M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 3, p. 178-182, 2005.

SENEDA, M. M., SANTOS, G. M. G., SILVA, K. C. F., SPEGIORIN, M. R., BLASCHI, W., PONTES, J. H. F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina PR UEL, 2006. p. 172-180.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G.; CUSTER, E. E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in post partum beef cattle. **Journal Animal Science**, v.68, p.799-816, 1990.

SHRESTHA, H.K., NAKAO, T., HIGAKI, T., SUZUKI, T., AKITA, M. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows. **Theriogenology**. v. 61, p. 637-649, 2004.

SIDDIQUI, M.A.R., SHAMSUDDIN, M., BHUIYAN, M.M.U., AKBAR, M.A., KAMARUDDIN, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in Zebu cows. **Reproduction Domestic Animal** v. 37, p. 37-41, 2002.

SILVA, J.M., PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P-450 aromatase but not cytochrome P-450 side-chain cleavage gene expression in estrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal Endocrinology**, v. 174, p. 499–507, 2002.

SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R., VAN TOL, H.T.A., ROELEN, B.A.J., FIGUEIREDO, J.R. Gene expression and protein localisation for activin-a, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **Journal Endocrinology**. v. 183, p. 405-15, 2004.

SILVA, K.C.F. **Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR.

SIMON, L., BUNGARTZ, L., RATH, D., NIEMANN, H. Repeated bovine oocyte collection by means of permanently rinsed ultrasound guide aspiration unit. **Theriogenology**, v. 39, p. 312 (abstract), 1993.

SIRARD, M. A., PICARD, L., DERY, M., COENEM, K., BLONDIN, P. The time between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 699-708, 1999.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology Reproduction.**, v.39, p.308-17, 1988.

SLENNINGL, B.D., WHEELER, M.B. Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. **Theriogenology**, v.31, p.653-673, 1989.

SNIJDERS, S.E.M., O'FARRELL, K., BOLAND, P. , DILLON, P. , DISKIN, M. , O'CALLAGHAN, D. , MEE, J.F. Effect of genetic merit on postpartum follicular development, milk production, body weight, and insulin and glucose levels in dairy cows. **Proceedings British Society nimal Science**, 188 (Abstr.), 1998.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction.** v.3, p.147-60, 2005.

SOUZA, J. A. T., MACEDO, N. A., CARTER, J. A. Eficiência de doadoras e receptoras de embriões segundo a época do ano, a categoria e genótipo das receptoras. **Acta Science Veterinary.**, v. 35, p. 1235, 2007 (resumo).

SPELBRING, M. C., MARTIN, T. G., DREWRY, K. J. Maternal productivity of crossbred Angus x Milking Shorthorn cows. I. Cow and calf weights and scores. **Journal Animal Science**, v. 45, p. 969–975, 1977.

SPICER, L.J., ALPIZAR, E., ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulose cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production *in vitro*. **Journal Animal Science.** v. 71, p. 1232-1241, 1993.

SPICER, L.J., STEWART, R.E., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on cell proliferation, luteinizing hormone receptors, and basal and LH-induced steroidogenesis of bovine thecal cells. **Journal Animal Science.** v. 73, p. 219, 1995.

SPICER LJ, FRANCISCO CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. **Endocrinology**, v.138, p. 3374–3379, 1997.

SPICER, L.J., CHASE JR., C.C., RUTTER, L.M. Relationship between serum insulin-like growth factor-I and genotype during the postpartum interval in beef cows. **Journal Animal Science.** v. 80, p. 716-722, 2002a.

SPICER L.J., CHAMBERLAIN, C.S., MACIEL, S.M. Influence of gonadotropins on insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 22, p. 237-254, 2002b.

SPITZER, J.C., MORRISON, D.G., WETTEMANN, R.P., FAULKNER, L.C. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. **Journal Animal Science**. v. 73, p. 1251-1257, 1995.

STABENFELDT, G. H., EDQVIST, L. E. **Processos reprodutivos na fêmea**. In: SWENSON, M. J., REECE, W. O. Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, p 615 644, 1996.

STAGG, K., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M., ROCHE, J.F. Follicular development in long-term anestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**. v. 38, p. 49-51, 1995.

STEVENSON, J.S., KNOPPEL, E.L., MINTON, J.E., SALFEN, B.E., GARVERICK, H.A. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **Journal Animal Science**. v. 72, p. 690-699, 1994.

STEWART, R.E., SPICER, L.J., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E. Effects of insulinlike growth factor-I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal Animal Science**. v.73, p. 3719-3731,1995.

STOCK, A.E., SMITH, L. Developmental of bovine oocytes from small follicles is enhanced after maturation in medium conditioned by oocytes from big follicles. **Biology Reproduction**, v. 55 , p.174 :(472), 1996. Abstr.

TAKAHASHI, Y., FIRST, N.L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**. v. 37, p. 963-78, 1992.

TALBERT, G. B. **Aging of the reproductive system**. In: FINCH, C. E. and HAYFLICK, L. Handbook of the biology of aging. Chicago Van Nosrand, p. 318-56, 1977.

TALBERT, G B., KHRON, P. L. Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. **Journal Reproduction Fertility**. v 11. p.318-56, 1977.

TECHAKUMPHU, M., PROMDIREG, A., NA-CHIENGMAI, A., PHUTIKANIT, N. Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves

after FSH superstimulation. **Theriogenology**. v. 61, n. 9, p. 1705-1711, 2004.

TORRES JR., J. R. S. **Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S., PIRES, M. F. Á., SÁ, W. F., FERREIRA, A. M., VIANNA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A., RAMOS, A. A., FOLHADELLA, I. M., POLISSENI, J., FREITAS, C., CLEMENTE C. A. A., SÁ FILHO, M. F., SOUZA, A. H., BARUSELLI, P. S. Efeito da codominância de folículos no momento da aspiração folicular sobre a recuperação e competência *in vitro* de oócitos *Bos indicus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 20., 2006, Araxá. **Anais...** Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. p. 473. Resumo.

TRIBULO, H.; BO, G. A.; JOFRE, F. et al. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 35, p. 286 1991 (resumo).

VAN DEN HURK, R., ABIR, R., TELFER, E.E., BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproductive Update**. v.6, p.457-74, 2000.

VAN DEN HURK, R, ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.1717-51, 2005.

VARAGO, F.C., MENDONÇA, L.F., LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M., SANGSRITAVONG, S.J., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**. v.60, p. 795-807, 2003.

VASSENA, R., MAPLETOFT J.R., ALLODI S., SINGH.J., ADAMS P.G. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p 923-932, 2003.

VERNON, R.G., DENIS, R.G.P., SORENSEN, A. Signals of adiposity. **Domestic Animal Endocrinology**. v.21, p. 197-214, 2001.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F. Dinâmica folicular em vacas da raça Gir. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**. Suple., 26, p. 378, 1998.

VIANA, J.H.M., TORRES, C.A.A., FERNANDES, C.A.C. Ovarian follicular population and superovulatory response in beef cattle. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.16, n.2, p.175-179, 1999.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., CAMARGO, L.S.A, SÁ, W.F., ARAÚJO, M.C.C., FERNANDES, C.A.C., MARQUES Jr, A.P. Efeito da administração de progestágenos exógenos sobre a produção de oócitos em vacas submetidas à punção folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1,p. 342, 2000a.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in Zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000b.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A, FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., FERNANDES, C.A.C., ARAÚJO, M.C.C., RAMOS, A.A., MARQUES Jr, A.P. Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 630, 2002.

VIANA, J.H.M., NASCIMENTO, A.A., PINHEIRO, N.L., FERREIRA, A.M., CAMARGO, L.S.A, SÁ, W.F., MARQUES Jr, A.P. Caracterização de sequêlas subseqüentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. V. 23, n.3, p. 119-124, 2003.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., FERNANDES, C.A.C., MARQUES JUNIOR, A.P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA J.H.M., CAMARGO L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35(Supl. 3), s915-s924, 2007.

VIANA, L.C., GEBER, S., MARTINS, M.M.F. **Ginecologia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 758p. 1998.

VIKER, S.D., LARSON, R.L., KIRACOFÉ, G.H., STEWART, R.E., STENVENSON, J.S. Prolonged postpartum anovulation in mastectomized cows requires tactile stimulation by the calf. **Journal Animal Science**. v.71, p. 999-1003, 1993.

VILLA-GODOY, A., HUGHES, T.L., EMERY, R.S., CHAPIN, L.T., FOGWELL, R.L. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**. v.71, p.1063-1072, 1988.

VITT, U.A., MCGEE, E.A., HAYASHI, M., HSUCH, A.J. In vivo treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**. v. 141, p.3814-20, 2000.

VOM SAAL, F. S., FINCH, C. E.; NELSON, J. M. **Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates**. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. The Physiology of Reproduction. 2. ed. New York: Raven press, v. 2, p 1213-1214, 1994.

WAGNER, J. J., LUSBY, K. S., OLTJEN, J. W., RAKESTRAW, J., WETTEMANN, R. P., WALTERS, L. E. Carcass composition in mature hereford cows: Estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 603-612, 1988.

WAGNER, J. O., CLARKSON, T. B., St. CLAIR, R. W., SCHEWNKE, D. C., SHIVEL, Y. C. A., ADAMS, M. R. Estrogen and progesterone replacement therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. **Journal Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p 1995-2002, 1991.

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

WALTON, J. S.; CHRISTIE, K. A.; STUBBINGS, R. B. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. **Theriogenology**, v. 9, n. 1, p. 6, 1993.

WATHES, D.C., CHENG, Z., BOURNE, N., TAYLOR, V.J., COFFEY, M.P., BROTHERSTONE, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 33, p. 203–225, 2007.

WEBB R., GARNSWORTHY P.C., GONG J-G. & ARMSTRONG D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**. v.82, p.63-74, 2004.

WEBB, R., CAMPBELL, B.K. Development of the dominant follicle; mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. **Reproduction Domestic Ruminants**. Supl. VI, v.64, p.140-163, 2007.

WHEELER, M.B., RUTLEDGE, J.J., BROWN, A.F., VANETTEN, T., MALUSKY, S., BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219–227, 2006.

WHISNANT, C.S., THOMPSON, F.N., KISER, T.E., BARB, C.R. 1986. Effect of naloxone on serum luteinizing hormone, cortisol and prolactin concentrations in anestrous beef cows. **Journal Animal Science**. v. 62, p. 1340-1345, 1986.

WILDMAN, E. E., JONES, G. M., WAGNER, P. E., BOWMAN, R. L., TROUTT, H. F., LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 495, 1982.

WILLIAMS, G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 8331-852, 1990.

WILLIAMS, G. L., GAZAL, O. S., GUZMÁN VEGA, G. A., STANKO, R. L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 289-297, 1996.

WILSON, R.D., FRICKE, P.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., RUTLEDGE, J.J., PENFIELD, C.M., WEIGEL, K.A. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, n.6, p. 1007-1015, 2006.

WILTBank, J.N., ROWDEN, W.W., INGALLS, J.E. Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. **Journal Animal Science**. v. 21, p. 219-225, 1962.

WILTBank, M.C., GÜMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WISE, P. M., KASHON, M. L., KRAJNAK, K. M., ROSEWELL, K. L., CAI, A., SCARBROUGH, K., HARNEY, J. P., MCSHANE, T., LLOYO, J. M., WEILAND, N. G. Aging of the female reproductive system: a window into brain aging. **Recent Progress Hormone Research**, v 52, p279-302, 1997.

WIT, A.A.C., WURTH, Y.A., KRUIP, T.A.M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 1277-83, 2000.

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.

WRIGHT, I. A., RHIND, S. M.; RUSSEL, A. J. F., WHYTE, T. K., MCBEAN, A. J., MCMILLEN, S. R. Effects of body condition, food intake and temporary calf separation on the duration of the post-partum anoestrus period and associated LH, FSH and prolactin concentrations in beef cows. **Animal Production**, v. 45, p. 395–402, 1987.

WRIGHT , P.J., MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. **Applied Food Animal Practice.**, v.8 p.57-59, 1992.

YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1259-1266, 1999a.

YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M.P. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and *in vitro* fertilization and development of oocytes recovered from beef heifers. **Animal Reproduction Science.** v. 55, p. 1-12, 1999b.

YAVAS, Y., WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology.** v. 54, n. 1, p. 25-55, 2000.

YEH, J., KIM, B., PERESIE, J.; LIANG, Y.J., ARROYO, A. Serum and ovarian Müllerian inhibiting substance, and their decline in reproductive aging. **Fertility and Sterility**, v 87, n. 5, p1227-30, 2007.

YIN, W., GORE, A. C. Neuroendocrine control of reproductive aging roles of GnRH neurons. **Reproduction**, v. 131, p403-414, 2006.

ZALESKY, D.D., FORREST, D.W., MCARTHUR, N.H., WILSON, J.M., MORRIS, D.L., HARMS, P.G. Suckling inhibits release of luteinizing hormone-releasing hormone from the bovine median eminence following ovariectomy. **Journal Animal Science.** v. 68, p. 444-448, 1990.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, p.447–54, 2001.

ZHANG, M., LU, K.H., SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology.** v. 60, p. 1657–63, 2003.

ZHAO, J., TAVERNE, M.A.M., VAN DER WEIJDEN, G.C., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology Reproduction.** v. 65, p. 967-77, 2001.

ZIELAK, A.E., FORD, N., PARK, S.D.E., DOOHAN, F., COUSENS, P.M., SMITH, G.W., IRELAND, J.J., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Identification of novel genes associated with dominant follicle development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p. 967–975, 2007.

## 10. ANEXOS.

Tabela 16 - Composição mínima da ração experimental.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Proteína Bruta (PB)	18
Nutrientes Digestíveis Totais (NDT)	84
Fósforo (P)	0,5
Cálcio (Ca)	1,17

Tabela 17 - Níveis minerais mínimos/ kg de sal mineral utilizado no experimento.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Cálcio (Ca)	120g
Fósforo (P)	82g
Magnésio (Mg)	15g
Sódio (Na)	121g
Enxofre (S)	2,2g
Cobalto (Co)	130mg
Cobre (Cu)	1160mg
Flúor (F)	1120mg
Iodo (I)	120mg
Manganês (Mn)	1325mg
Selênio (Se)	33mg
Zinco (Zn)	4670mg

Quadro 1: Descrição do escore da condição corporal (ECC) de vacas Gir (*Bos taurus indicus*).

<b>Escore da condição corporal relacionado com o aspecto do animal</b>		
<b>ECC</b>	<b>Condição Corporal</b>	<b>Aspecto</b>
1	Debilidade	Percebe-se visivelmente o aspecto caquético do animal extremamente magro sem gordura detectável sobre os processos vertebrais espinoso e transverso ou sobre os ossos da bacia e costelas.
2	Muito magra	Pouca musculatura sobre a coluna vertebral, sem depósitos de gordura.
3	Magra	A musculatura lombar apresenta aspecto convexo em relação perpendicular a coluna vertebral. Alguns depósitos de gordura, costelas visíveis.
4	Limite	A musculatura lombar apresenta-se plana. Costelas dianteiras não perceptíveis.
5	Moderada	Aparência geral boa. Musculatura lombar esta de plana para ligeiramente côncava. A 12 <sup>a</sup> e 13 <sup>a</sup> costelas não são visíveis.
6	Boa	É preciso aplicar pressão firme sobre a espinha para sentir os processos espinhosos. Há bastante gordura palpável sobre as costelas e ao redor da inserção da cauda. A musculatura lombar encontra-se côncava e o aspecto geral é de uma novilha muito boa. Ainda percebe-se o contorno ósseo da tuberosidade ilíaca.
7	Muito Boa	Abundância de gordura na inserção da cauda. Aparecem "cintos" e "bolos" de gordura. Já se nota alguma gordura ao redor da vulva e na virilha. A tuberosidade ilíaca e isquiádica (ossos da garupa) tem a forma arredondada e estão cobertas de gordura.
8	Gorda	Animal muito gordo e super condicionado. Cobertura espessa e densa de gordura. Grande depósito de gordura sobre as costelas, na região da inserção da cauda e abaixo da vulva.
9	Obesa	Excesso de gordura em todo o corpo com a aparência de um bloco.

**ESCORE 2****ESCORE 3****ESCORE 4****ESCORE 5****ESCORE 6****ESCORE 7****ESCORE 8**

Figura 6 – Figuras dos escores da condição corporal (ECC) de vacas Gir (*Bos taurus indicus*).

Tabela 18 – Resultado individual por aspiração, da produção *in vitro* de oócitos totais e viáveis, de embriões, da relação oócitos totais e oócitos viáveis, e da conversão de oócitos em embriões, no pós-parto de oito vacas doadoras da raça Gir (*Bos taurus indicus*) do rebanho experimental.

VACA	DOADORAS		OÓCITOS		OÓCITOS	EMBRIÕES	EMBRIÕES/
	ORD. PART.	DPP	TOTAIS	VIÁVEIS	%	n	OÓCITOS
A	1	17	69	32	46	9	30
A	1	35	78	50	73	17	34
A	1	71	50	31	62	12	39
B	1	15	24	15	62	5	33
B	1	35	15	7	47	4	57
B	1	56	25	22	88	1	5
C	1	25	12	8	67	6	75
C	1	46	19	12	63	8	66
C	1	71	20	10	50	7	70
D	1	18	27	21	77	2	10
D	1	32	57	40	70	3	7
D	1	53	47	37	78	0	0
E	1	25	5	3	60	1	33
E	1	45	5	4	80	0	0
E	1	62	5	5	100	0	0
F	2	28	28	19	68	19	100
F	2	48	56	33	59	23	67
F	2	69	25	22	88	7	32
G	6	15	22	15	68	3	20
G	6	35	33	17	51	3	18
G	6	56	21	15	71	1	7
H	8	13	12	9	75	0	0
H	8	34	16	16	84	5	31
H	8	62	22	22	100	6	27

ORD.PART. = Ordem de parto da doadora. DPP = número de dias pós-parto no momento da aspiração folicular.

Tabela 19 - Número médio de oócitos totais, oócitos viáveis e blastocistos, por sessão de aspiração da doadora, nos grupos de vaca (GR) classificadas por: tratamentos de ablação do folículo dominante pré-aspiração folicular (ABLA) ou grupo controle, dentro dos nas classes de escore corporal (CECC) alto ou baixo, e nas classes de ordem de parto: das primíparas e múltíparas. Os números são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão das médias (EPM).

GR	TRAT.	CECC	ORD. PAR.	OÓC. TOT.	OÓC. VIÁV.	BLAST.*	n
1	ABLA.	BAIXO	Primíparas	36,2 $\pm$ 21,5	22,27 $\pm$ 2,4	7,85 $\pm$ 1,14 <b>a</b>	23
2	ABLA.	BAIXO	Múltíparas	27,0 $\pm$ 17,9	15,9 $\pm$ 2,3	5,56 $\pm$ 1,07	26
3	ABLA.	ALTO	Primíparas	31,3 $\pm$ 10,9	16,4 $\pm$ 4,5	7,13 $\pm$ 2,11	6
4	ABLA.	ALTO	Múltíparas	38,9 $\pm$ 18,7	25,6 $\pm$ 3,5	7,71 $\pm$ 1,65	10
5	CONT.	BAIXO	Primíparas	30,2 $\pm$ 17,6	20,0 $\pm$ 1,7	4,86 $\pm$ 0,82 <b>b</b>	41
6	CONT.	BAIXO	Múltíparas	25,7 $\pm$ 12,3 <b>b</b>	15,9 $\pm$ 1,8 <b>b</b>	2,83 $\pm$ 0,87 <b>B</b>	37
7	CONT.	ALTO	Primíparas	21,5 $\pm$ 8,0	13,31 $\pm$ 4,4	2,67 $\pm$ 2,09	6
8	CONT.	ALTO	Múltíparas	39,9 $\pm$ 15,8 <b>a</b>	27,1 $\pm$ 1,9 <b>a</b>	7,49 $\pm$ 0,91 <b>A</b>	32

TRAT. = Tratamento de ablação do folículo dominante pré aspiração folicular (ABLA.)

CONT. = Tratamento controle GR = Grupo de vacas com três classificações.

CECC = Classes de escore corporal pós parto: CECC alto= ECC 6 e 7, CECC baixo = ECC 3 a 5.

BLASTO.= Blastocistos n = numero de aspirações no grupo.

\* letras maiúsculas ou minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste do Qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .