

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICUS SENSU EM PRODUÇÃO
CAMPUS DESCALVADO- SP**

JHIENNY CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA PETRY

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS DAS RAÇAS
NELORE E GREYMAN.**

***IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION IN NELORE AND GREYMAN
CATTLE BREEDS**

2020/2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTUS SENSU EM PRODUÇÃO
ANIMAL**

JHIENNY CRITSINA OLIVEIRA DA SILVA PETRY

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS DAS RAÇAS
NELORE E GREYMAN.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Prof(a). Dr(a). Cássia Maria Barroso Orlandi
Orientador(a)

DESCALVADO – SP
2020/2021

Petry, Jhienny Cristina Oliveira da Silva
P595p Produção in vitro de embriões em vacas das raças Nelore e
Greyman:
expansão das células do cúmulus de oócitos oriundos de folículos
ovaria-
nos, em diferentes dimensões, acompanhados ou não da
presença de
corpo lúteo (CL) / Jhienny Cristina Oliveira da Silva Petry. –
Descalvado:
Universidade Brasil, 2021.
90 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Gradua-
ção em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos
requi-
sitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção
Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

1. Zebuíno. 2. Oócitos. 3. Maturação. 4. Fertilização. 5.

PIVE.
I. Título.

636.291

CDD

TERMO DE APROVAÇÃO



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Jhienny Cristina Oliveira da Silva Petry

“Expansão das células do *cumulus* e produção *in vitro* de embriões em vacas nelore e vacas greyman”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi
(Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal

Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal

Prof. Dr. Heder Nunes Ferreira
(Coordenador adjunto e docente na Faculdade Pio Décimo)

Descalvado, 28 de abril de 2021

Prof. Dr. Cássia Maria Barroso Orlandi
Presidente da Banca

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://universidadebrasil.edu.br/portal/cursos/ppgpa/>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“Expansão das células do *cumulus* e produção *in vitro* de embriões em vacas nelore e vacas greyman”**

Autor(es): Jhienny Cristina Oliveira da Silva Petry, Willian Boni, Vando Edésio Soares, Gabriel Maurício Peruca de Melo, Heder Nunes Ferreira e Cássia Maria Barroso Orlandi.

Discente: Jhienny Cristina Oliveira da Silva Petry

Assinatura: Jhienny Cristina O. da Silva Petry

Orientador: Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

Assinatura: Cássia Maria Barroso Orlandi

Data: 28 de abril de 2021.

DEDICATÓRIA

Consagre ao Senhor tudo que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.

(Provérbios 16:3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pela dádiva da vida e pela oportunidade de realizar esse mestrado. Agradeço ao meu esposo Ismael, pelo incentivo desde o início, apoiando nos momentos difíceis e pela compreensão nas ausências para cumprimento das atividades. Agradeço a minha mãe Luzinette, ao meu padrasto José Carlos, meu avô Alcides, minha irmã Elaine por serem a base de minha vida.

Aos meus sogros Orlando e Mirtes pelo acolhimento em sua casa nos decorrer das aulas, meus cunhados Vagno, Carin, Alencar e Luana, pelo incentivo e apoio prestado. Aos meus sobrinhos Israel e Eloisa por ser alegria nas horas mais difíceis.

Agradeço a parceria do Laboratório Embryofiv, pessoa do Médico Veterinário Wiliam Boni e sua esposa Tayna Biondo, por proporcionar a oportunidade de realizar essa pesquisa na empresa, por todos os ensinamentos, atenção e pelos procedimentos realizados no decorrer da pesquisa, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe.

A pessoa do senhor Jaime Boni, empresa Nelore JLB, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo de funcionários, e por ceder vacas Nelore doadoras para realização do experimento, à equipe Nelore JLB que não mediram esforços para auxiliar no trabalho.

Agradeço ao Projeto Murray Grey Rondônia, pela parceria em disponibilizar as doadoras da Raça Greyman, pelas informações e orientações prestadas. Ao Zootecnista Carlos Di Carli pelo auxílio e orientações sobre a raça. Agradeço ao Abatedouro Almeida pela parceria nas coletas de ovários.

Meus agradecimentos à minha orientadora Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi, que foi mais que orientadora, foi “parceira”, sempre esteve ao meu lado proporcionando conhecimento na execução deste projeto. Agradeço as palavras e orientações nos momentos difíceis, bem como a toda a equipe de professores, gestores e discentes da turma de Mestrado stricto sensu Profissional em Produção Animal, da Universidade Brasil.

Às minhas amigas de turma de mestrado, Jackeline e Dilma, por me passarem todos os conteúdos ministrados nas sextas-feiras e durante o sábado, “aos amigos mais chegados que irmão”. Aos meus familiares e amigos, que de alguma forma, contribuíram e torceram pelo meu sucesso, o meu muito obrigado.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS DAS RAÇAS NELORE E GREYMAN.

RESUMO

A compreensão dos fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para otimização da eficiência reprodutiva nos rebanhos. Particularidades reprodutivas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* devem ser levadas em consideração na aspiração folicular guiada por ultrassom aliada à produção *in vitro* de embriões. O sucesso da OPU (Ovum pick up) / PIVE (produção *in vitro* de embriões), depende de vários fatores, dentre os quais, o número de oócitos obtidos por colheita, o qual influencia a eficiência da técnica e caracteriza o rendimento de oócitos em relação ao número de folículos aspirados. Neste sentido, na busca do entendimento das repostas fisiológicas dos complexos cumulus oócitos (CCOs) submetidos à maturação *in vitro*, foram realizados dois experimentos. O primeiro avaliou a expansão das células dos cumulus de oócitos submetidos à maturação *in vitro*, após aspiração de folículos em diferentes dimensões, acompanhados ou não pelo corpo lúteo (CL). Para tanto, ovários de abatedouro foram submetidos à aspiração, seguidos de rastreamento, seleção e maturação de oócitos. Imagens da expansão das células do cumulus mensuradas após 24 horas de maturação foram registradas, indicando o potencial da aspiração de folículos < 3 mm, os quais apresentaram melhores resultados na ausência de CL. O achado permite maior exploração da OPU em termos de visualização, punção e recuperação de folículos menores subutilizados, os quais somariam ao rendimento de oócitos obtidos, resultando em melhores índices de PIVE. No segundo experimento, os índices da PIVE foram comparados em vacas doadoras das raças Nelore (n=5) e Greyman (n=5) submetidas à OPU, com intervalo de 30 dias, totalizando três réplicas de aspiração. A raça Greyman, introduzida e adaptada recentemente na região Norte do Brasil, apresentou potencial na PIVE. Embora o rendimento da OPU em vacas da raça Greyman não tenha sido eficiente como nas vacas da raça Nelore, os índices da PIVE mostraram-se compatíveis aos índices obtidos nas vacas Nelore.

Palavras-chave: Zebuino. oócitos. maturação. fertilização. PIVE.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS DAS RAÇAS NELORE E GREYMAN.

ABSTRACT

The understanding of follicle growth and ovulation associated to physiological phenomenon is fundamental to optimize reproductive efficiency in the herd. Reproductive particularities between *Bos indicus* and *Bos taurus* must be taken into account when using ultrasound guided follicle trans-vaginal aspiration/ ovum pick up (OPU) in conjunction with produced in vitro embryo (PIVE). Successful OPU/PIVE depends on a variety of factors, as oocyte numbers per aspiration section; which influences the technique efficiency and characterizes the oocyte recovery rate per aspirated follicle. Thus, searching for physiological responses from cumulus oocyte complex (COCs) submitted to in vitro maturation; two experiments were performed: the first experiment evaluated the oocyte cumulus cells expansion from oocytes submitted to in vitro maturation after been obtained by OPU from ovarian follicles with different dimensions, in the presence or absence of corpus luteum (CL). Slaughter house ovaries were obtained and submitted to aspiration, classification, selection and oocyte maturation. Expansion images from cumulus cells were taken, and measured after 24 hours from start of maturation. The measures results, reflecting maturation, indicated the potential in aspirating follicles < 3mm, with better results when in absence of CL. These finding requires an exploration from OPU and its capability in terms of small follicles visualization, aspiration and oocyte recovery from sub utilized small follicles in the field. These follicles could add in OPU oocyte recovery, and possibly results in better PIVE index. In the second experiment, PIVE in Nelore (n=5) and Greyman (n=5) cattle breeds were compared. The cows were submitted to OPU every 30 days, with a total of three (n=3) OPU sections. Greyman cattle were recently introduced and adapted to North region of Brazil and the donor cattle from this breed presented a reasonable potential for PIVE. Despite of the fact that oocytes recovery rates in Greyman cows were not efficient as they were in Nelore cows, the in vitro fertilized (IVF) embryos indexes from Greyman were compatible with Nelore cow.

Keywords: Zebu. oocytes. maturation. fertilization. PIVE

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

O experimento I avaliou uso de maior número de folículos na superfície ovariana, considerando folículos inferiores a 3 mm, não comumente usados para aspiração *in vivo* guiada por ultrassom, etapa inicial na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Complexos cumulus oócitos (CCOs) de folículos < 3mm e provenientes de ovários sem corpo lúteo apresentaram maturação compatível àqueles de folículos maiores que 3mm, normalmente aspirados para PIVE. O potencial para a aspiração de folículos menores subutilizados e aumento do número de oócitos obtidos por sessão mostrou-se promissor. As informações são relevantes para PIVE em raças menos favorecidas, quanto ao rendimento de oócitos obtidos por sessão de aspiração a campo e subsequente maturação satisfatória. O experimento II verificou a performance de vacas doadoras das raças Nelore e Greyman, com menor rendimento em número de oócitos por sessão de aspiração para Greyman em relação às Nelore. Resultados da PIVE para Greyman foram compatíveis aos índices das zebuínas. No entanto, rendimento de oócitos por sessão foi inferior nas Greyman em relação às Nelore. O aumento da frequência de aspirações e o aproveitamento de folículos < 3mm, considerando o potencial de maturação dos oócitos verificado no experimento I, podem influenciar positivamente índices da PIVE de raças menos favorecidas como a Greyman e aumentar a produção das mesmas.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Etapas dos procedimentos durante obtenção, processamento e maturação oocitária..... | 39 |
| Figura 2 – Transportador de Oócitos – TREO® (WTA)..... | 40 |
| Figura 3 – Mensurações dos CCOs oriundos de folículos pequenos, médio e grandes..... | 41 |
| Figura 4 – Distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da expansão das células do cumulus observadas nos CCOs obtidos a partir de folículos G, M e P..... | 44 |
| Figura 5 – Distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da porcentagem de expansão das células do cúmulus observadas nos CCOs obtidos a partir de folículos G, M e P..... | 44 |
| Figura 6 – Expansão e porcentagem de expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos em ovários com e sem corpo lúteo..... | 45 |
| Figura 7 – Expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos P, M e G em ovários com e sem corpo lúteo | 45 |
| Figura 8 – Porcentagem de expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos P, M e G em ovários com e sem corpo lúteo..... | 46 |
| Figura 9 – EmbryoFiv Fertilização In Vitro..... | 50 |
| Figura 10 – Organograma dos procedimentos para a PIVE – Exp 2. II | 50 |
| Figura 11 – Protocolo de sincronização hormonal das vacas receptoras de embrião | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos | 34 |
| Tabela 2 – Classificação da qualidade dos oócitos bovinos | 35 |
| Tabela 3 – Médias e porcentagem média da expansão das células do cumulus em CCOs submetidos à maturação in vitro..... | 43 |
| Tabela 4 – Número médio e classificação de CCOs obtidos na OPU de vacas Nelore Greyman | 54 |
| Tabela 5 – Classificação dos complexos cumulus oócitos em vacas Nelore e Greyman submetidas à OPU..... | 55 |
| Tabela 6 – Índices da PIVE e taxas de prenhez em vacas Nelore e Greyman..... | 56 |
| Tabela 7 – Índices da PIVE e taxas de prenhez obtidos em vacas Nelore e Greyman..... | 57 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| AMPC | Adenosina Monofosfato Cíclico |
| CCs | Células do Cumulus |
| CCL | Com Corpo Lúteo |
| CEUA | Comissão de Ética na Utilização de Animais |
| CFA | Contagem Folicular antrais |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| CL | Corpo Lúteo |
| COCs | Competência dos Cumulos Oócitos |
| D0 | Dia inicial |
| D3 | Terceiro dia |
| D5 | Quinto Dia |
| D8 | Oitavo Dia |
| D9 | Nono Dia |
| D17 | Decimo Sétimo Dia |
| DF | Dominância Folicular |
| DMA | Diferencialmente Metelado |
| FP | Folículo Pequeno |
| FM | Folículo Médio |
| FG | Folículo Grande |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| GMPC | Guanosina Monofosto Cíclica |
| GnRH | Hormônio Liberador de Gonadotrofina |
| HSOF | Meio de Envase |
| IGF | Fator de Crescimento Insulina |
| IGF-1 | Fator de Crescimento Insulina tipo I |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| MIV | Maturação In Vitro |
| MII | Metáfase II |

| | |
|--------------|---|
| NG | Nanograma |
| OPU | Aspiração Folicular Guiada Por Ultrassonografia |
| P | Pequeno |
| M | Médio |
| G | Grande |
| P/C | Por Cabeça |
| PIVE | Produção In Vitro de Embriões |
| P4 | Progesterona |
| SCL | Sem Corpo Lúteo |
| SOF | Meio de Cultivo |
| T 0H | Tempo Zero Hora |
| T 24H | Tempo Vinte e Quatro Horas ³ |
| VG | Vesícula Germinativa |
| VS | Versus |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 Objetivos específicos | 20 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 3.1 Origem e introdução da raça Murray Grey em Rondônia..... | 20 |
| 3.1.1 Particularidades reprodutivas das fêmeas de raças <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> | 22 |
| 3.1.2 Corpo lúteo na ciclicidade da fêmea bovina..... | 27 |
| 3.1.3 Produção <i>in vitro</i> de embrião (PIVE)..... | 31 |
| 4. EXPERIMENTO I | 38 |
| EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CÚMULUS DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLICULOS OVARIANOS, EM DIFERENTES DIMENSÕES, ACOMPANHADOS OU NÃO DA PRESENÇA DE CORPO LÚTEO (CL) | 38 |
| 4.1 Hipóteses | 38 |
| 4.2 Objetivo geral | 38 |
| 4.2.1 Objetivo específicos | 38 |
| 4.3 Materiais e Métodos | 38 |
| 4.3.1 Obtenção, processamento e avaliação da maturação oocitária | 38 |
| 4.3.2 Análise estatística | 42 |
| 4.4 Resultados e Discussão | 42 |
| 4.5 Conclusão | 48 |
| 5. EXPERIMENTO II | 49 |
| PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES NELORE E GREYMAN | 49 |
| 5.1 Hipótese | 49 |
| 5.2 Objetivo geral | 49 |
| 5.2.1 Objetivos Específicos | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3 Material e Métodos | 48 |
| 5.3.1 Local | 48 |
| 5.3.2 Animais..... | 49 |
| 5.3.3 Punção Folicular Guiada por Ultrassonografia (OPU)..... | 50 |
| 5.3.4 Rastreamento e Maturação <i>in vitro</i> (MIV)..... | 51 |
| 5.3.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)..... | 51 |
| 5.3.6 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) / “Feeding” e avaliação da taxa de clivagem..... | 52 |
| 5.3.7 Avaliação da taxa de blastocistos e inovulação de embriões..... | 52 |
| 5.3.8 Diagnóstico Gestacional (DG)..... | 52 |
| 5.4 Análise Estatística | 54 |
| 5.5 Resultados e Discussões | 54 |
| <i>REFERÊNCIAS</i>..... | 59 |
| ANEXO I- MEIOS DE MATURAÇÃO | 69 |
| <i>ANEXO II – PORTIFÓLIO MATURAÇÃO EXPERIMENTO I</i> | 73 |
| ANEXO III- TABELA DE EXPANSÃO EXPERIMENTO I | 84 |
| ANEXO IV- TABELA DE EXPANSÃO DAS CÉLULAS DOS CUMULUS..... | 86 |
| ANEXO V- RÉPLICA EXPERIMENTO II..... | 87 |

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2018 foram produzidos 341.583 mil embriões *in vitro* zebuínos e taurinos, nos seguimentos de bovinos de corte e leiteiro (STBE, 2018). Nos últimos dez anos, o Brasil tornou-se o país líder no mundo em relação ao número de embriões produzidos *in vitro* (EUROPAN, 2009), fato atribuído ao elevado número de folículos e oócitos recuperados de fêmeas *Bos indicus* (HEAD, 1989). Este índice tem estimulado estudos voltados às diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus* quanto ao potencial reprodutivo e a produção *in vitro* de embriões.

As fêmeas *Bos indicus* têm maior número de ondas foliculares (NASCIMENTO, 2013) por ciclo e maior população de folículos antrais, com 5 mm de diâmetro, quando comparadas às fêmeas *Bos taurus* (RUSHEN, 2007). Além disso, os folículos dominantes e os corpos lúteos (CL) são menores e o estro é mais curto nas fêmeas *Bos indicus* (TRILLO, 2016). Desta forma, a compreensão dos fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para otimizar as biotecnologias da reprodução e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

Existem particularidades reprodutivas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que devem ser levadas em consideração quanto ao emprego de técnicas de manejo, de inseminação artificial, transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultrassom aliada à produção *in vitro* de embriões.

Estas ferramentas permitem o melhoramento genético bovino e, possibilitam o aumento do número de descendentes com alto valor genético. Dentre as técnicas citadas, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual utiliza oócitos obtidos de ovários de vacas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos. Neste último caso, a ovariectomia e laparoscopia foram preconizadas, embora, atualmente, a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom é a técnica mais utilizada comercialmente (TESSMANN, 2004).

O sucesso da OPU/PIVE depende de vários fatores: genética, raça e idade dos animais (ROCHA et al., 1998); estação do ano (ALKATANANI et al., 2002), origem e qualidade dos oócitos (RIZOS et al., 2002), condições de cultivo dos oócitos e experiência do técnico, assim como, do número de oócitos obtidos por aspiração (WATSON et al., 2000; LONERGAN et al., 2003)

Em função do clima tropical, o Brasil necessita de bovinos que se adaptem às variações climáticas e à sazonalidade para manutenção de boa produção de leite e carne. Como exemplo, surgiram raças sintéticas, como a Girolando, representada pelo cruzamento de 5/8 Holandês x 3/8 Gir, para a produção de leite e a raça Brangus, cruzamento de 5/8 Angus x 3/8 zebu, para a produção de carne (ZANIN, 2013). Tais cruzamentos proporcionam novos resultados quanto ao desempenho de características produtivas e traz a necessidade de estudos quanto o potencial reprodutivo destas raças.

Buscando cruzamentos com a base zebuína, uma nova raça *Bos taurus* foi introduzida no Brasil, a Murray Grey, a qual surgiu a partir do cruzamento de um touro Aberdeen Angus com uma vaca White Shorthorn, resultando nas primeiras linhagens produzidas em 1905, no vale do Rio Murray, na Austrália. O cruzamento do Murray Grey com Brahman, por meio do uso da transferência de embriões deu origem à raça Greyman.

No entanto, são escassas as informações quanto às particularidades da raça resultante deste cruzamento, no que diz respeito ao potencial de produção de embriões *in vitro*, considerando a adaptação às condições climáticas do país e, principalmente, da região Norte. No estado de Rondônia, encontra-se a maior concentração de rebanhos desta raça.

A complexidade dos processos envolvidos na produção *in vitro* de embriões, desde a aspiração folicular até o estabelecimento da prenhez, traz a necessidade de conhecimento quanto às possíveis diferenças nas respostas fisiológicas das fêmeas bovinas. Neste sentido, a raça Greyman, recentemente introduzida no estado de Rondônia, apresenta grande potencial para a produção de carne, embora sejam escassas informações sistemáticas sobre o seu desempenho quando submetida às técnicas de reprodução assistida, como a PIVE.

Fatores como adaptação ao clima e nutrição disponível nesta região, influenciam nas respostas fisiológicas reprodutivas encontradas na raça, possivelmente diferenciando a mesma de raças mais adaptadas, como as zebuínas. Baseado no questionamento acima, e considerando o desempenho de diferentes raças na PIVE, o presente estudo comparou o processo da PIVE entre vacas Nelore e vacas Greyman, com ênfase nas avaliações da etapa de maturação oocitária.

2 OBJETIVOS

Verificar o potencial de maturação de oócitos obtidos a partir de folículos ovarianos de diferentes dimensões, na presença ou ausência de corpo lúteo (Experimento 1).

Comparar os índices da PIVE em vacas doadoras das raças Nelore e Greyman (Experimento 2).

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a maturação *in vitro* por meio da expansão das células do cúmulus em CCOs provenientes de folículos dentro de três categorias (< 3mm, 3 a 9 mm e > 9mm), na presença e ausência de corpo lúteo (Experimento 1).

Determinar e comparar os índices da PIVE (número de oócitos viáveis obtidos na OPU, taxa de clivagem embrionária, blastocistos, blastocistos transferidos e prenhez) em doadoras Greyman e Nelore (Experimento 2).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Origem e introdução da raça Murray Grey em Rondônia.

A origem da raça Murray Grey, se deu por volta do ano de 1905, na província de Victoria, na Austrália, nas margens do rio Murray. A propriedade era formada por vários rebanhos de Aberdeen (KOUNDU, 2018).

O ano de 1905 fez parte de um período de quarenta anos, no qual a Austrália foi submetida a secas extremas, alternadas por chuvas torrenciais. Em 1902, não havia lugar em toda a Austrália forragem área suficiente com forragem para pastejo e relacionamento do gado. Estima-se que metade da população australiana de ovinos morreu de fome nesta mesma época. A condição da seca levou a um processo casual, resultando na formação da raça Murray Grey.

Com a seca, os *Sutherlands*, donos da propriedade na qual a raça foi originada, foram forçados a comprar vacas para substituir as perdas de seu rebanho. Dentro dos lotes de vacas adquiridas havia vacas da raça Shorthorn, de cores cinza clara, sendo tal aquisição involuntária. As vacas foram expostas aos touros Angus, procriando-se bezerros de tons acinzentados claros ou brancos acinzentados, o que diferenciava os lotes de bezerros do rebanho.

Os cruzamentos foram então sucessivamente sistematizados, até que em 1940 um touro Murray Grey foi acasalado com vacas Angus. O produto desse cruzamento originou uma proporção de sua progênie da mesma cor cinza (neve ou branco), com rápido aumento em ganho de peso e melhor conversão alimentar. A partir daí foi criada a associação “Murray Gray Beef Cattle Society”, da Austrália. Por ser dominante, a diluição de cor da pelagem varia desde branco neve, ao branco prata, podendo nascer alguns baios claros (bege), mas a seleção é feita para predomínio da pelagem branca (LAGOS, 2015).

O Murray Grey se considera puro na quarta geração sobre a vaca Angus puro de origem PO (93,75%), desde que a origem do rebanho materno tenha sido Angus. Em 2000, foi tomada a decisão de permitir a reintrodução da genética do Angus na raça Murray Grey, uma medida adotada por muitos criadores para expandir sua base genética (KOUNDU, 2018).

A genética original tem um ótimo relacionamento com o Aberdeen Angus, dado o processo de melhoramento genético da raça, caracterizada por uma base genética limitada e uniforme, com um genótipo de alto componente homozigoto. Esse fator determina dois principais efeitos nos programas de cruzamento em que está incluído: a fixação rápida de caracteres (cor, conformação e temperamento) e grande vigor híbrido. O Murray Grey além de herdar a fertilidade, a qualidade da carne e a precocidade do Aberdeen Angus, agrega, ainda, a pelagem clara e a docilidade necessária para formar raças sintéticas e cruzamentos ideais para zonas quentes. Como cruzamentos de melhores resultados para zonas quentes, cita-se: Greyman (Murray Grey x Nelore ou Brahman) e o cruzamento de Murray Grey com Senepol, resultando no Senegrey (LAGOS, 2015).

O cruzamento do Murray Grey com o Nelore tem resultado em animais de cor padronizada e pelagem curta. Todos os bezerros nascidos, mesmo tendo sido cruzados com o gado Nelore padrão, de chifres, nasceram mochos (KOUNDU, 2018).

Os pecuaristas começaram a trabalhar com a raça há quatro anos, importando material genético e, inicialmente, no intuito de produzir o meio-sangue. No entanto, resultados favoráveis levaram ao investimento na criação da raça pura. Hoje o que se busca na pecuária é a obtenção de animais precoces, dóceis, com boa terminação de carcaça, com carne diferenciada (marmoreio) para um mercado consumidor cada vez mais exigente. No estado de Rondônia, a raça foi introduzida por um grupo de veterinários e zootecnistas do Cone Sul, os quais buscaram nos países como Uruguai

e Argentina exemplares das raças para implantação de programas de cruzamento em fazendas localizadas na região de Cabixi, em Rondônia (ARDENGHY, 2018).

O cruzamento de Murray Grey x Brahman, deu origem à raça Greyman, resultando inicialmente em 23 machos e 22 fêmeas nascidos no Mato Grosso e trazidas para Rondônia. Estes animais foram criados até o desmame a campo e com proteinado no creep feeding, após o desmame, foram levados para região de Cabixi, no cone sul do estado de Rondônia. Deixados em regime de campo (Brachiara) e sal proteinado de baixo consumo.

De acordo com Ardenchy (2018), os machos nasceram em setembro de 2016 com aproximadamente 32 kg, foram desmamados dentro de 8,5 meses, com 331 kg de peso médio, com 15 meses obtiveram o peso médio de 420 kg, com um ganho de peso médio de 0,460 kg/dia. Os machos foram vendidos aos 20 meses, com 570 kg de média p/c. e com ganho de peso do desmame até os 19 meses de 1,22 kg/dia .

As fêmeas também nasceram no mês de setembro de 2016, com aproximadamente 30 kg, a desmama ocorreu com 8,5 meses de idade, com peso médio de 356 kg . Estas fêmeas estão em processo de coleta de embriões que serão fecundados com sêmen Greyman $\frac{1}{4}$ de onde nascerão os Greyman $\frac{3}{8}$ que serão usados em repasse para a formação do Greyman $\frac{5}{8}$, que é semelhante ao Brangus, com o diferencial da pelagem clara e da docilidade (ARDENCHY, 2018).

3.1.1 Particularidades reprodutivas das fêmeas de raças *Bos indicus* e *Bos taurus*

Quanto aos aspectos reprodutivos, diferenças entre fêmeas bovinas *Bos indicus* e *Bos taurus* são observadas, tanto na dinâmica, quanto nas estruturas ovarianas (SARTORI et al., 2016). O diâmetro do folículo ovulatório, assim como o volume médio do CL são menores em animais *Bos indicus* comparados àqueles de animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016). Apesar de menores estruturas ovarianas, fêmeas *Bos indicus* apresentam maiores concentrações séricas de hormônios esteroides, progesterona e estrógeno do que fêmeas taurinas e estas diferenças são observadas tanto em fêmeas com CL funcional, quanto com fontes exógenas destes hormônios (SARTORI et al., 2016).

Novilhas *Bos taurus* apresentam maturidade sexual e puberdade mais cedo que novilhas *Bos indicus* (RODRIGUES et al., 2002). Zebuínos criados nos trópicos expressam idade estimada de puberdade entre 16 e 40 meses, enquanto animais *Bos*

taurus entram em puberdade 6 a 12 meses mais cedo (ABEYGUNAWARDENA & et al ; DEMATAWEWA, 2004; NOGUEIRA, 2004).

Apesar de maiores concentrações de estrógeno, fêmeas zebuínas desenvolvem cios mais curtos, com duração em média de 12 horas e com manifestação noturna, enquanto animais taurinos manifestam cio por mais tempo, duração média de 16 horas (SARTORI et al., 2016). Porém, em fêmeas leiteiras de alta produção, mais frequentemente em animais taurinos da raça Holandesa, o cio também tende a ser mais curto, em consequência da alta taxa de metabolismo (WILTBANK et al., 2006). Além disso, mais da metade dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de cio no período da noite (entre 18:00 e 6:00 horas), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de cio.

Wolfenson et al (1995) demonstraram que vacas Holandesas em lactação e novilhas púberes apresentam predominância de duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Por outro lado, vacas da raça Gir apresentam a incidência de três até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GAMBINI et al., 1998).

Além das diferenças no ciclo estral e no número de ondas foliculares, a população de pequenos folículos no ovário de vacas Nelore é maior que em ovários de vacas Holandesas e o diâmetro do folículo dominante e do folículo ovulatório é maior em vacas Holandesas (SARTORI et al., 2010). A duração da gestação em *Bos indicus* é mais longa que a do *Bos taurus* (292 vs. 282 dias em média, respectivamente (PASCHAL et al., 1991).

O uso da ultrassonografia permite melhor compreensão da dinâmica folicular ovariana de bovinos. Esta ferramenta ajuda a compreender as alterações fisiológicas, morfológicas e endócrinas do ciclo estral de fêmeas, incluindo o crescimento, regressão de folículos ovarianos e ovulação, bem como, as alterações no CL (ZACARIAS, 2015).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. O número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral nos animais taurinos é, predominantemente, de duas e três ondas (GINTHER et al., 1989). Entretanto, em zebuínos, vários estudos relatam a maior incidência de três ondas, sendo também observada a presença de quatro (FIGUEIREDO et al., 1997; REIS et al., 2005; COUTINHO et al., 2007) e de até cinco ondas de crescimento folicular por ciclo estral (VIANNA et al., 2000). Observa-se, também, diferentes comprimentos de onda em um

mesmo animal (REIS et al., 2005) e alterações no número destas de um ciclo para outro (COUTINHO et al., 2007). A ocorrência de duas ondas tem sido associada a ciclos mais curtos, enquanto três ou quatro ondas a ciclos mais longos (COUTINHO et al., 2007).

Segundo Ginther et al. (1996), a duração da fase lútea determina o número de ondas de crescimento folicular e a ocorrência de terceira onda está relacionada com fase luteal mais prolongada. Borges et al. (2004) afirmaram que há diferença no intervalo entre estros de vacas Zebu, sendo menor nos ciclos com duas ondas (18 dias), quando comparado com ciclos de três ondas (20 dias) e de quatro ondas (25 dias).

Em um estudo recente foi feita a análise temporal da dinâmica folicular de novilhas da raça Holandesa e da raça Gir mantidas sob as mesmas condições de manejo ambiental e nutricional. Foram demonstradas diferenças significativas entre o número de ondas foliculares por ciclo estral, sendo de $2,6 \pm 0,17$ para as fêmeas da raça Holandesa e $3,4 \pm 0,24$ para as fêmeas da raça Gir, o número de folículos recrutados após a primeira onda folicular foi menor nas novilhas Holandesas ($26,1 \pm 1,7$) do que nas novilhas Gir ($66,2 \pm 15,9$), os diâmetros dos folículos dominantes ($11,8 \pm 0,73$ e $9,4 \pm 0,52$) e o diâmetro máximo do corpo lúteo ($26,8 \pm 0,54$ e $22,3 \pm 0,98$) foram maiores nas novilhas da raça Holandesa em comparação as novilhas da raça Gir, respectivamente (BALDRIGHI, 2013).

Coutinho et al. (2007), em estudo com vacas Guzerá, observaram diferença na taxa de crescimento do folículo em ciclos com duas e três ondas. Nos ciclos de duas ondas, a velocidade de crescimento é menor ($0,80 \pm 0,01$) do que a do ciclo com três ondas ($1,09 \pm 0,10$). Isto ocorre porque o folículo da terceira onda está sob baixa concentração de progesterona. Em relação à persistência, o folículo dominante de ciclos com duas ondas persistiu por mais dias do que o de ciclos com três ondas (BORGES et al., 2004; COUTINHO et al., 2007).

O diâmetro máximo do folículo dominante é variável, quando comparado em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Em *Bos taurus*, são descritos diâmetros máximos de folículos dominantes, em ciclos com duas ondas, de 17,1 e 16,5 mm, para a primeira e segunda onda folicular, respectivamente e de 16,0 - 12,9 e 13,9 mm, em ciclos de três ondas (GINTHER et al., 1989).

Em *Bos indicus*, os diâmetros relatados foram de 13 e 14 mm para duas ondas, 13,0, 10,6 e 13,2 mm para três ondas (BORGES et al., 2004) e 10,75 - 9,75 - 9,0 e

13,25 para quatro ondas (VIANA et al., 2000). O menor valor com relação aos zebuínos pode estar relacionado à menor taxa de crescimento dos folículos dominantes (FIGUEIREDO et al., 1997).

Foi observado menor diâmetro do segundo folículo dominante do ciclo de três ondas, que pode ser explicado devido à baixa concentração plasmática de progesterona na primeira onda (CL em formação).

A segunda onda já começa na presença de um CL totalmente formado, secretando elevadas concentrações de progesterona, suficientes para inibir a liberação de LH. A terceira onda coincide com a luteólise e redução da secreção de progesterona pelo CL, resultando no aumento da frequência de pulsos de Hormônio Luteinizante LH. Este fato também pode estar relacionado à menor duração de crescimento dos folículos da segunda onda (4,6 e 5,4 dias), quando comparado com os folículos da primeira (6,3 dias) e terceira ondas (6,1 dias) (BORGES et al., 2004).

Com relação aos folículos subordinados, o diâmetro máximo foi de 6,4 a 8,0 mm (BORGES et al., 2004; COUTINHO et al., 2007), com período médio de crescimento de 2,6 dias e persistência de 4,7 a 9,5 dias. Estes valores são próximos aos encontrados em taurinos (BORGES et al., 2004).

Estudos recentes realizados com ambos os grupos genéticos, em condições ambientais e nutricionais contemporâneas mostraram que animais *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos no dia da emergência da onda em relação aos *Bos taurus* (CARVALHO et al. 2008; GIMENES et al. 2008). CARVALHO et al. (2008) sincronizaram a ovulação de novilhas das raças Nelore, Angus, Gir. Neste estudo, as fêmeas *Bos indicus* (Nelore e Gir, combinadas) apresentaram $33,4 \pm 3,2$ folículos ao início da onda folicular, enquanto novilhas *Bos taurus* (Angus e HPB, combinadas) tiveram $25,4 \pm 2,5$ folículos ($P = 0,09$). Similarmente, GIMENES et al. (2008) observaram que novilhas da raça Nelore tiveram $29,7 \pm 3,1$ folículos no momento da emergência da onda e que novilhas da raça HPB apresentaram $15,0 \pm 2,8$ folículos.

A onda de crescimento folicular ocorre desde o recrutamento folicular, onde há o crescimento do grupo de folículos que faz a ativação do folículo primordial. Os folículos antrais em fêmeas bovinas começam seu desenvolvimento quando um folículo dominante (FD) cresce mais do que os outros folículos subordinados, e pode, posteriormente, sofrer atresia ou ovular (GINTHER et al., 1989).

Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem maior recrutamento de folículos menores que 5mm por onda de crescimento folicular em *Bos indicus* ($33,4 \pm 3,2$) do que em *Bos taurus* ($25,4 \pm 2,5$) (BARUSELLI et al., 2007; NOGUEIRA, 2008).

Esse aumento do número de folículos ovarianos pode estar relacionado às diferenças nos sistemas ovarianos de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. SIMPSON et al. (1994), em um estudo com vacas Brahman, relataram maiores concentrações plasmáticas de IGF-I e menores concentrações de hormônio folículo-estimulante (FSH), quando comparadas com vacas Angus. Os autores sugeriram que o maior número de folículos recrutados nas vacas Brahman possa ser devido às altas concentrações de IGF-I. Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I resulta em folículos menos persistentes obtendo maior número de ondas foliculares e maior incidência de ciclos com quatro ondas (BARUSELLI et al., 2007; NOGUEIRA, 2008).

A divergência folicular é marcada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros. Em *Bos taurus*, o desvio inicia-se por volta de 2,8 dias após a emergência, quando o folículo dominante atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2 mm (GINTHER et al., 1996). Em *Bos indicus* este período é de 2,5 a 2,7 dias pós- emergência e com diâmetro médio do folículo de 6,0 mm (SARTORELLI et al., 2005).

Randel (2005) descreve que a raça zebuína apresenta recrutamento de ondas foliculares maior que a taurina. Silva -Santos et al. (2011), avaliaram em *Bos indicus* vs *Bos taurus* as secções histológicas de ovários de fetos, novilhas e vacas e concluíram que há grande variação individual no número de folículos do ovário de zebuínos comparado com taurinos. Analisando ovários de novilhas, Erickson (1966) relatou que logo após o nascimento, apenas alguns folículos antrais podem ser vistos macroscopicamente (7 ± 2), mas esse número começa a aumentar a partir de dois meses em bezerras mais velhas (49 ± 10). Os autores observaram também que essa quantidade tende a diminuir em oito meses de idade nos animais (33 ± 9).

Adamset al. (1994) monitoramento fêmeas pré- púberes com 9 meses de idade, em raças *Bos taurus* descobriram que o crescimento folicular ocorre também em padrão de onda. Os autores relataram que as bezerras apresentaram duas ondas foliculares em um intervalo de 18 dias. Evans et al. (1994) ao estudarem a dinâmica folicular e a secreção de gonadotrofinas em bezerras HEREFORD (0,5 a 9 meses de

idade *Bos taurus*) observaram maior diâmetro máximo dos folículos dominantes e subordinados em 0,5 a 2 meses de idade de vitelos. Os autores concluíram que há aumento das concentrações de gonadotrofinas entre 1 a 3,5 meses de idade.

3.1.2 Corpo lúteo na ciclicidade da fêmea bovina

O corpo lúteo durante o ciclo estral passa por intensas modificações na composição tecidual, no peso e no diâmetro luteal (AKINPELUMI & ORJI, 1990; FIELDS E FIELDS, 1996). Após a ovulação, até o dia 5 do ciclo, o corpo lúteo mostra-se em processo de formação, apresentando textura leve e cor avermelhada. Entre os dias 5 e 10, se apresenta grande e oval e com coloração de marrom a laranja. Dos dias 11 ao 14, apresenta completa luteinização, com textura firme e cor amarela brilhante. No período de 5 a 14, o corpo lúteo apresenta crescimento rápido e aumento do peso, devido à alta proliferação celular (AKINPELUMI & ORJI, 1990).

Vianna et al. (1999), estudando animais da raça Gir, encontraram 57,14% de incidência de CL no ovário direito e Ramos et al. (2008) 56,23% de ocorrência no ovário direito, em animais zebuínos. Neves et al. (2002), analisando ovários de vacas Nelore, e Akinpelumi e Orji (1990), em vacas White Fulani, encontraram maior incidência do CL no ovário esquerdo. Chacur et al. (2006) encontraram 65,47% de corpos lúteos, no ovário esquerdo, em animais zebuínos não gestantes.

Existem diferenças no tamanho do corpo lúteo quando se compara animais zebuínos e taurinos, com variações de 17 a 21 mm de diâmetro nos zebuínos (FIGUEIREDO et al., 1997; BARUSELLI et al., 2007). Neves et al. (2002) encontraram diâmetro luteal médio, em vacas Nelore não-gestantes de 15,3mm no ovário esquerdo, 16,4 para ovário direito e, em gestantes, 18,4mm no esquerdo e 18,7 no direito. Chacur et al. (2006), em vacas zebus, encontraram 16,70mm para o esquerdo e 15,75 para o direito. Já, em vacas holandesas, taurinas, os valores observados são maiores que os de animais zebuínos, sendo os valores encontrados de 20 a 30mm (IRELAND et al., 1980; GINTHER et al., 1989; TAYLOR E RAJAMAHENDRAN, 1991).

No trabalho de Reis et al. (2006), as vacas com CL apresentaram melhor desempenho que as vacas sem a presença de CL em relação às seguintes variáveis: maior número de oócitos coletados dos dois ovários, mais oócitos de melhor

qualidade, maior taxa de clivagem para zigotos que clivaram, além de produzirem, em geral, maior número de embriões aos 7 dias após a fertilização *in vitro* (FIV).

Machatková et al. (1996) concluíram que ocorre maior produção *in vitro* de embriões quando se utilizam oócitos aspirados durante o predomínio de CL no ciclo estral e, segundo Manjunayha et al. (2007), ocorrem maiores taxas de clivagem e de embriões transferíveis quando os oócitos são provenientes de ovários onde o CL está ativo.

Neves et al. (2002) e Ramos et al. (2008) observaram, em zebuínos, maior incidência de CL incluso do que protruso, em ambos os grupos gestante e não-gestante, sendo a maior porcentagem de inclusos nos animais gestantes. Cavidades luteais podem ser observadas em corpos lúteos de animais gestantes (86%) e não gestantes (77%) (KASTELIC et al., 1990). Neves et al. (2002) encontraram 2,3% de animais Nelore gestantes com cavidade luteal e 16,3% para não gestantes. Já BORGES et al. (2003) observou 46,7% de cavidades luteais em Nelore. O aparecimento destas cavidades foi aos 4,8 e 6,7 dias após a ovulação e a área máxima variou de 0,1 e 0,5mm em 78,3% dos casos, entre o sétimo e o décimo dia.

A persistência média das cavidades foi de 5,0 a 10,5 dias e, em alguns casos, permaneceu por até 17 dias. Segundo os autores, essa diferença no tempo de permanência das cavidades ocorre devido à reorganização gradual do tecido e tende a desaparecer com o transcorrer do ciclo estral. Cavidades luteais podem ocorrer devido à ocupação incompleta da cavidade folicular pelas células, durante a luteinização, não sendo funcionalmente importantes e não influencia a taxa de gestação ou a produção de progesterona (KASTELIC et al., 1990; BORGES et al., 2003).

Quanto à concentração de progesterona por grama de tecido luteínico, a mesma também se apresentou inferior em zebuínos, quando comparada à de fêmeas taurinas (BARUSELLI et al., 2007). Em animais zebuínos são observadas concentrações abaixo de 1ng/mL, no estro, ocorrendo elevação até o décimo dia e alcançando valores máximos de 4,5ng/ml (ADEYEMO e HEATH, 1980).

O corpo lúteo domina o ciclo, do dia 4 até cerca do dia 17 (BALL et al., 2006), com duração média da fase lútea de $10,0 \pm 2,62$ dias (COUTINHO et al., 2007). BORGES et al. (2003) detectaram o corpo lúteo em vacas Nelore e Gir pela primeira vez, por volta de $2,6 \pm 0,7$ dias, após a ovulação. Outros relatos demonstraram que os corpos lúteos podem ser detectados, no dia $4,0 \pm 1,31$, em vacas da raça Guzerá,

permanecendo detectável à ultrassonografia por $15,37 \pm 2,06$ dias, mas funcionais durante $13,37 \pm 2,72$ dias. Estes valores encontrados dependem da técnica utilizada e da raça do animal (COUTINHO et al., 2007).

BORGES et al. (2003), estudaram, com o uso de ultrassom, o CL de vacas das raças Gir e Nelore, durante o verão e inverno e observaram que a duração do CL foi de 16 dias para animais com duas ondas de crescimento folicular e 17,9 dias para animais com três ondas. O CL teve taxa de crescimento de 0,3 a 0,5 cm /dia, atingindo o maior tamanho entre os dias 9,3 e 9,5 do ciclo estral.

Por meio da contagem folicular, se faz possível indicar a capacidade reprodutiva da fêmea, tendo este parâmetro sido muito estudado nos últimos anos (IRELAND et al., 2008). A contagem folicular pode ser realizada de duas maneiras, a primeira é por meio da ultrassonografia, com a qual é realizada somente a contagem de folículos antrais (CFA). A segunda, consiste na leitura de lâminas histológicas de cortes de porções do ovário, na qual é possível realizar a contagem de folículos pré-antrais, folículos antrais, corpos lúteos, corpos albicans, além de detectar o estágio do ciclo estral e verificar anomalias. No entanto, a contagem de folículos por meio da histologia é mais utilizada em pesquisa básica envolvendo estudos de morfofisiológica ovariana.

Segundo Ireland et al. (2009), a contagem de folículos antrais possui correlação positiva com a fertilidade em fêmeas bovinas. Enquanto a contagem de folículos pré-antrais, nem sempre possui correlação positiva com a CFA. A CFA foi correlacionada com a quantidade da reserva folicular ovariana em *Bos taurus* (CUSHMAN et al., 2009; IRELAND et al., 2011), o que não se verificou em *Bos indicus* (SILVA-SANTOS et al., 2011 e ROSA et al., 2013). Algumas características morfológicas, como tamanho e dimensão do útero, da vulva e dos ovários também foram relacionadas com a CFA. Conde et al. (2013), por exemplo, encontraram relação positiva entre CFA e diâmetro uterino em fêmeas bovinas.

Em taurinos e mestiços, a CFA foi relacionada à qualidade oocitária e embrionária (IRELAND et al., 2008; SILVA-SANTOS et al., 2014). Menor síntese de progesterona e baixo desenvolvimento do endométrio foram detectados nas fêmeas com número baixo de folículos antrais (JIMENEZKRASSEK et al., 2009). Recentemente, avaliando a possível relação entre CFA, diâmetro do folículo ovulatório e CL em vacas *Bos indicus*, Morotti et al. (2014) não encontraram

diferenças nas vacas com alta CFA (≥ 40) quando comparadas com baixa CFA (≤ 10), embora as vacas com alta CFA tenham apresentado ovários com maiores dimensões.

Posteriormente, Mossa et al. (2012) encontraram resultados da influência da CFA sobre a fertilidade das vacas Holandesas submetidas a programas de inseminação artificial, a partir da observação e identificação do cio. Em consequência, estudos realizados com *Bos taurus* têm relacionado maiores índices de prenhez às taxas mais elevadas de CFA (CUSHMAN et al., 2009; EVANS et al., 2012; MOSSA et al., 2012).

Contraopondo alguns estudos realizados com *Bos taurus*, Mendonça et al. (2013) e Santos et al. (2014) com *Bos indicus* e animais meio-sangue não observaram a mesma correlação entre prenhez e CFA. Ainda, Santos et al. (2013) encontraram maiores taxas de concepção em vacas com baixa CFA, evidenciando que os resultados ainda não demonstram a mesma correlação em *Bos indicus* (MOROTTI et al., 2015), quando comparado a *Bos taurus*.

Animais *Bos indicus* apresentam, frequentemente, três ondas de crescimento folicular por ciclo e maior número de folículos pequenos (2 a 5 mm de diâmetro) na emergência da onda folicular. Isto difere de animais *Bos taurus*, que apresentam menor número de folículos recrutados e duas a três ondas foliculares (SARTORI et al., 2016).

A CFA pode ser determinada pela contagem de todos estes folículos recrutados, maiores que 3 mm, por meio do exame ultrassonográfico dos ovários (MOROTTI et al., 2015).

Recentemente, a CFA tem sido sugerida como parâmetro de seleção para animais de alta fertilidade e rendimento para OPU e PIVE, devido sua alta repetibilidade em um mesmo indivíduo e sua grande variabilidade entre indivíduos. Além disso, sabe-se que apenas um exame ultrassonográfico, mesmo que desconhecida a fase do ciclo, é suficiente para definir com assertividade a CFA de um animal (IRELAND et al., 2007, 2008; MOROTTI et al., 2017).

Em animais *Bos taurus*, a CFA está diretamente relacionada a parâmetros de fertilidade (IRELAND et al., 2007; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; MOSSA et al., 2012) porém em animais *Bos indicus* a relação da CFA com o sucesso reprodutivo ainda não está bem elucidada (MOROTTI et al., 2017). Em animais taurinos, a baixa CFA está relacionada a menor capacidade das células luteínicas em produzir progesterona, resultando em menores níveis séricos e maior amplitude de LH pré-

ovulatório, que por sua vez, estão relacionados a insensibilidade dos tecidos ovarianos à este hormônio (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

Junto com estas descobertas, foram constatadas diferenças na quantidade de alguns RNAs mensageiros dentro das células da granulosa, maiores níveis de FSH e menor espessura do endométrio nos animais taurinos de baixa CFA (IRELAND et al., 2007; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009). Estes parâmetros estão relacionados à infertilidade e morte embrionária precoce (IRELAND et al., 2007).

Mossa et al. (2012) ao utilizarem fêmeas taurinas, constataram que a taxa de prenhez (>60 dias) foi 3,3 vezes maior para animais de alta CFA e a prenhez ao primeiro serviço foi 1,7 vezes maior para animais de contagem intermediária, quando comparados aos animais de baixa CFA submetidos à Inseminação Artificial (IA) convencional. Além disso, o estudo também relatou menor intervalo do parto à concepção para vacas de alta CFA e maior probabilidade de prenhez ao final da estação (MOSSA et al., 2012).

Embora promissores, existem algumas divergências entre resultados mais recentes em animais taurinos (MARTINEZ et al., 2016; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017). Ao passo que, se considerarmos animais zebuínos, a relação da CFA com a fertilidade parece ser ainda mais complexa (MOROTTI et al., 2017). Até o momento, não foi possível correlacionar animais com alta CFA às maiores taxas de prenhez ou concepção. Na verdade, os resultados encontrados em *Bos indicus* sugerem melhores taxas de concepção em animais de baixa CFA (MENDONÇA et al., 2013; SANTOS et al., 2013). É possível que os mecanismos relacionados à fertilidade e a alta CFA encontrados em animais taurinos (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009) não sejam os mesmos, ou não respondam da mesma maneira em animais zebuínos, devido às diferenças fisiológicas.

3.1. 3 Produção *in vitro* de embrião (PIVE)

A fertilização *in vitro* é uma tecnologia disponível para todo o território nacional, e vem sendo utilizada amplamente. Isso se fez possível com o surgimento de rede de atendimento, nas quais laboratórios de biotecnologia passaram a atuar nos estados mais longínquos, dessa forma originou-se então um processo que permite uma logística mais flexível por parte das equipes de coleta e de transferência (ABCZ, 2014).

Independente da espécie estima-se que a PIVE possa aumentar o ganho genético anual acima de 10%, quando aplicada apropriadamente, principalmente pela possibilidade de cruzamentos fatoriais, diminuindo a taxa de consanguinidade, bem como pela utilização de fêmeas pré-púberes. Além disso, com a PIVE pode-se ter uma produção maciça de animais mestiços, possibilitando a manutenção de rebanhos com o grau de sangue desejado, o que é impossível com o uso da monta natural e inseminação artificial (Sugimoto, 2012). O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (Gonçalves et al., 2002)

A OPU foi desenvolvida para atender à demanda por um procedimento para coleta de complexo cumulus-oócito, cujo objetivo seria o uso de uma técnica menos traumática que as abordagens cirúrgicas até então utilizada. A grande vantagem da técnica está o fato de ser pouco invasiva, outra peculiaridade muito importante e o fato de não depender de pré-estimulação hormonal, podendo ser usada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes e inclusive em animais que apresentam gestação inicial (VIANA & BOLS 2005).

A fêmea bovina é classificada como poliéstrica anual, tendo o ciclo estral com duração de, aproximadamente, 21 dias, variando entre 18 e 24 dias. O ciclo estral bovino pode ser dividido, didaticamente, em quatro fases, de acordo com a ocorrência de eventos fisiológicos e endócrinos: estro, metaestro, diestro e proestro (CAETANO E CAETANO JR., 2015). O estágio do ciclo estral no momento da OPU influencia as taxas de recuperação e a qualidade oocitária em programas PIV (MERTON et al. 2003; VASSENA et al. 2003; HENDRIKSEN et al. 2004).

Melhores taxas de recuperação oocitária são relatadas quando a OPU é realizada próximo à emergência folicular, sendo também descritas melhor desenvolvimento da competência *in vitro* quando oócitos são obtidos durante a fase precoce de dominância folicular (MERTON et al. 2003; HENDRIKSEN et al. 2004; MACHATKOVÁ et al. 2004).

A aquisição da competência oocitária é adquirida gradualmente e aumenta com o desenvolvimento folicular. Sabe-se que esta competência está relacionada ao tamanho do folículo, estágio do ciclo estral e nível de atresia influenciado pelo folículo dominante, sendo que aqueles podem adquirir a capacidade de competência se os folículos procedentes alcançarem 7 mm em tamanho (PAVLOCK et al., 1992).

Além desses aspectos, têm sido observadas diferenças na competência durante o ciclo estral em termos de presença ou ausência de um folículo, independentemente do tamanho do folículo, sendo que o desenvolvimento ao estágio de blastocisto fez-se melhor quando os oócitos obtidos durante a fase de crescimento, em comparação com a fase de dominância (HAGEMANN, 1999; MACHATKOVÁ et al., 2004; FERREIRA, 2011). A presença de um folículo dominante inibe o crescimento dos demais folículos e estes entram em atresia. Por isso, para aumentar a competência ao desenvolvimento dos CCOs recuperados, recomenda-se a sincronização da onda de crescimento folicular das doadoras de oócitos. Assim, os oócitos são recuperados no início da onda folicular, evitando os efeitos prejudiciais do folículo dominante (PFEIFER et al., 2009). Além disso, o tamanho uniforme dos folículos possibilita melhores taxas de recuperação.

Em bovinos, a relação entre o tamanho do folículo e a qualidade do oócito foi claramente demonstrada recentemente. Labrecque et al. (2016) estudaram a quantidade e os tipos de proteínas em folículos de tamanhos diversos na espécie bovina e verificaram poucas diferenças entre o transcriptoma de folículos menores que 3 mm e de folículos de 3 a 5 mm.

No entanto, folículos maiores que 8 mm possuíam diferença abrupta em comparação aos folículos menores que 5 mm. Adicionalmente, outros estudos em bovinos avaliaram folículos de 3 a 8 mm, tendo sido relatados que os níveis de transcritos para os genes *Maternal Antigen That Embryo Requires (MATER)* e *Octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4)* em oócitos, em conjunto com a concentração de progesterona folicular, podem ser bons indicadores para a competência oocitária (URREGO et al, 2015).

, a competência oocitária é adquirida durante o crescimento folicular e está diretamente relacionada ao tamanho do oócito e do diâmetro folicular. Assim, há forte correlação entre oócitos que possuem em torno de 110-120 μm , inclusos em folículos a partir de 2-3 mm de diâmetro, os quais são considerados competentes para retomada da meiose (FAIR et al., 1995). É importante ressaltar que os folículos antrais pequenos são recrutados e iniciam o crescimento em direção à ovulação após atingirem diâmetro médio de 4 mm (GINTHER, et al., 2000).

Após esse estágio, o hormônio folículo estimulante (FSH) e diversos fatores de crescimento produzidos localmente no ovário bovino são responsáveis pelo crescimento folicular (MARTINS et al, 2008). À medida que os oócitos crescem, os

níveis de metilação em regiões diferencialmente metiladas (DMR) aumentam, demonstrando que a metilação é adquirida de acordo com o tamanho dos oócitos (O'DOHERTY et al, 2012).

Porém, há relatos que alelos metilados aberrantemente nos oócitos de folículos pequenos (≤ 2 mm) isolados aumentaram em comparação com a categoria de folículos médios (3-5 mm) e grandes (≥ 6 mm) quando cultivados *in vitro* (MATTERN et al, 2017). Além disso, Modina et al. (2011) mencionaram que os processos da diferenciação da estrutura e função da cromatina no oócito em vesícula germinativa (VG) são controlados pela cooperação das células somáticas na manutenção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) apropriado no interior do oócito.

As células do cumulus (CCs) tem grande relevância na manutenção da competência oocitária por meio das junções gaps. Em suínos, BAGG et al. (2009) relataram que *complexo cumulus oócitos* (COCs) de folículos de 3 mm mantem comunicação por meio de junções gap por mais tempo que COCs de folículos de 5 à 8 mm durante a maturação *in vitro* (MIV). Porém, a expansão das CCs e o acúmulo de AMPc (dentro e fora do oócito) é inferior em folículos de 3 mm quando comparados com folículos de 5 à 8 mm.

Além disso, outros estudos demonstraram que tanto os níveis de AMPc como monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), mudam nas primeiras 20 horas de MIV e esses níveis são diferentes entre COCs de folículos pequenos (1-3 mm) e médios (3-6 mm) (OKUDAIRA, 2017).

O processo de maturação *in vitro* inicia com a chegada dos oócitos aspirados ao laboratório, estes são mantidos em um meio de maturação. O período necessário para a maturação nuclear e espécies específico, sendo que para a espécie bovina a maturação nuclear do oócito requer um período de 18 a 22 horas (Hafez & Hafez, 2004). O meio de cultura mais utilizado para a maturação de oócitos é o TCM 199 acrescido de 10% de soro bovino, FSH, LH, estradiol e EGF. É necessária à utilização de uma incubadora de CO₂ (GALLO & LAZZARI, 2000), sendo uma temperatura ideal 39°C em atmosfera a 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2002).

Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos, na tentativa de identificar àqueles com maior potencial. De acordo com Leibfried; First (1979), os oócitos podem ser classificados em escala de 1 a 4,

considerando as características do *cumulus* e do citoplasma do oócito (ooplasma). A classificação do autor encontra-se na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos

| Oócitos | Descrição |
|---------------|--|
| GRAU 1 | <i>Cumulus</i> compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; |
| GRAU 2 | <i>Cumulus</i> compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, preenchendo o espaço do interior da zona pelúcida; |
| GRAU 3 | Espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado; |
| GRAU 4 | Oócito desnudo ou sem <i>cumulus</i> . |

Fonte: Modificado de LEIBFRIED; FIRST (1979).

Outras classificações quanto à morfologia e qualidade dos oócitos foram descritas e encontram-se na Tabela 2, a seguir (LOOS et al, 1991 & TETZNER , 2007).

Tabela 2 - Classificação da qualidade dos oócitos bovinos

| Oócitos | Descrição |
|-----------------|--|
| Grau I: | Revestimento com multicamadas de <i>cumulus</i> compacto, ooplasma homogêneo e complexo <i>cumulus</i> -oócito claro e transparente; |
| Grau II | Revestimento com 3 a 5 camadas de <i>cumulus</i> compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia; |
| Grau III | Pouco revestimento de células do <i>cumulus</i> (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose |
| Grau IV | Ou atrésico: <i>cumulus</i> expandido com células escuras e em grumos, e complexo <i>cumulus</i> -oocitário escuro e irregular |
| Desnudo | Sem camadas do <i>cumulus</i> e com ooplasma uniforme ou com granulações |

Fonte: Modificado de LOOS et al. (1991); Tetzner (2007).

O oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do CCO. Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo, com granulações finas, coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (GONÇALVES et al., 2002).

A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, o crescimento folicular e a presença ou ausência de células do *cumulus*, formando CCO, sendo esse último, necessário para o transporte de energia e a promoção da maturação do oócito bovino. A presença de células do *cumulus* circundando os oócitos parece ser mais importante para a maturação *in vitro* que até mesmo a atividade ovariana ou o tamanho folicular (SATO et al., 1977; FUKUI; SAKUMA, 1980).

As células do *cumulus oophorus* apresentam-se em policamadas compactas e, por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios LH e FSH entram em processo de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito (HYTTEL, 1987, 1988; SZÖLLÖSI, 1991). Essas células, assim como às da granulosa, são essenciais para a nutrição, crescimento, divisão meiótica, maturação citoplasmática e fecundação do oócito (EPPIG, 1980; FUKUI; SAKUMA, 1980).

Nas células somáticas que envolvem o oócito, durante as maturações citoplasmática e nuclear, ocorrem modificações morfológicas específicas. As células do *cumulus* iniciam um arranjo na matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, e tal fenômeno é denominado de expansão ou modificação das células do *cumulus* (EPPIG et al., 1982; BUCCIONE et al., 1990). *In vitro*, a expansão das células do *cumulus* é visível a partir das 12 horas de cultivo (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do *cumulus* impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de clivagem (LUVONI et al., 1996) e o choque térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS; HANSEN, 1997).

Ao final da etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Desta forma, deve ser feito o processamento do sêmen realizando-se uma seleção espermática e capacitação espermática. Após a capacitação dos espermatozoides, retira-se da estufa a placa de petri contendo os ovócitos maturados e depositam-se os espermatozoides, sempre procurando proporcionar um ambiente adequado (GONÇALVES et al., 2002).

O ponto mais importante no cultivo embrionário é o uso de meios que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. A composição do meio deve simular o ambiente e os fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação. O SOF é composto por secreções das células epiteliais,

a partir da difusão de nutrientes do plasma. O potássio e o cloro estão presentes no fluido de oviduto em concentrações mais elevadas do que nas do plasma, enquanto o nível de cálcio é mais baixo e os de sódio e magnésio são similares ao do soro (Gonçalves et al., 2002). Vários estudos têm demonstrado a utilização com sucesso de meios definidos de cultura, adicionando o PVA em substituição ao BSA e assim evitando a aderência dos embriões e as substâncias não conhecidas do BSA (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996).

Os métodos disponíveis para o tratamento de receptoras de embriões incluem a indução de estro com o uso da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ou seus análogos sintéticos e o emprego de hormônios para a sincronização da ovulação para TETF. A utilização de análogos da prostaglandina para indução de estro é um dos métodos menos dispendiosos para obtenção de receptoras aptas à transferência de embriões. O uso de protocolos de sincronização de estro ou de ovulação em receptoras de embrião tem como objetivo a obtenção de animais em fase do ciclo estral compatível com a fase de desenvolvimento embrionário. Entretanto, existem algumas condições imprescindíveis para seu uso, tais como, a detecção do corpo lúteo por palpação retal ou ultrassonografia e observação do comportamento estral nos dias subsequentes ao tratamento (Barreiros et al., 2006).

3.1.4 Fases Experimentais

Optou-se em organizar a presente dissertação em duas fases, sendo a fase inicial caracterizada pelo Experimento I, realizado *in vitro*, com obtenção de ovários de abatedouro e avaliação do potencial de expansão das células do cumulus em oócitos submetidos à maturação *in vitro*. Variáveis como: dimensão dos folículos aspirados para obtenção dos CCOs e presença ou ausência de CL no ovário selecionado foram consideradas.

Durante a segunda fase do estudo (Experimento II); avaliou-se a PIVE em vacas Nelore e Greyman, considerando morfologia oocitária, maturação, clivagem e produção de embriões transferíveis, assim como taxas de prenhez pós inovulação.

O experimento I foi realizado para a verificação de critérios e potencial da aplicação da OPU de folículos < 3mm, para aumento do rendimento de oócitos obtidos em raças menos favorecidas como a Greyman em termos de número de CCOs por aspiração quando comparadas às vacas da raça Nelore.

A seguir, os experimentos são descritos separadamente no item 4 (Experimento I) e no item 5 (Experimento II).

4. EXPERIMENTO I

EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CÚMULUS DE OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS OVARIANOS, EM DIFERENTES DIMENSÕES, ACOMPANHADOS OU NÃO DA PRESENÇA DE CORPO LÚTEO (CL)

4.1 Hipóteses

A expansão das células do cúmulus em oócitos menores que 3 mm é compatível com a utilização dos mesmos na OPU para PIVE, assim como, àqueles maiores que 3 até 9 mm; independente da presença do CL.

Oócitos oriundos de folículos maiores que 9 mm apresentam menor potencial de expansão e grau de classificação morfológica inferior àqueles oócitos obtidos à partir de folículos menores que 9 mm.

4.2 Objetivo geral

Avaliação da expansão das células do cúmulus de oócitos submetidos à maturação *in vitro*, após aspiração de folículos em diferentes dimensões, acompanhados ou não presença de corpo lúteo (CL).

4.2.1 Objetivo específicos

- Dimensionar a expansão das células do cúmulus de oócitos obtidos a partir de ovários de abatedouro antes e depois da maturação *in vitro*.
- Verificar a expansão das células do cúmulus pós-maturação *in vitro* de oócitos obtidos a partir de folículos classificados como pequenos, médios e grandes, na presença ou ausência de CL.

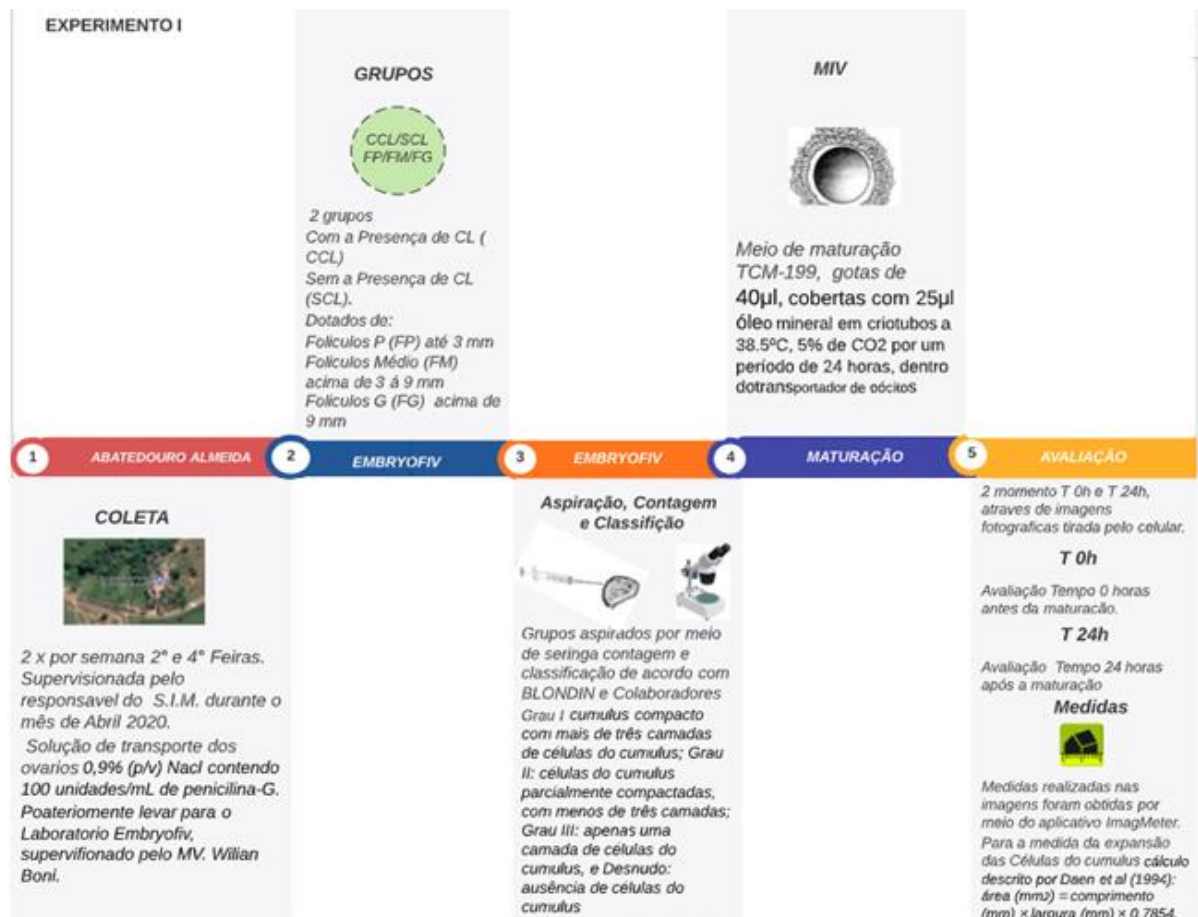
4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Obtenção, processamento e avaliação da maturação oocitária

Os ovários foram obtidos em abatedouro no decorrer do mês de Abril de 2020, duas vezes por semana, nas segundas e quartas-feiras, com oito repetições (n=8

réplicas), obtenção de 24 ovários por semana, totalizando 192 ovários, como representado na figura 1. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Brasil, protocolo número: 2000093.

Figura 1 - Etapas dos procedimentos durante obtenção, processamento e maturação oocitária



Fonte: Autoria própria

Local de Obtenção dos Ovários: Os ovários oriundos de vacas mestiças *Bos indicus*, foram obtidos no abatedouro Almeida, supervisão SIM- Inspeção Municipal localizado na linha 01 km 17, nas margens da BR 435 no município de Colorado do Oeste-RO.

Após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução salina de transporte (0,9% (p/v) NaCl contendo 100 unidades/mL de penicilina-G. Posteriormente os ovários foram levados ao laboratório de Fertilização *in vitro* Embryofiv, localizado na Chácara Pato Branco, Avenida Trombetas, nº16, Setor D, no mesmo município.

Processamento no Laboratório Embriofiv: Foram estabelecidos dois grupos experimentais baseados na presença ou ausência de CL nos ovários, ambos dotados de folículos pequenos, médios e grandes, acondicionados em Becker de 500 ml lavados em solução fisiológica pré- aquecida na temperatura de 37°C e mantidos nesta mesma solução em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos.

As categorias de dimensões foliculares foram previamente descritas por SCARABEL (2017), sendo folículos pequenos, até 3 mm (FP); médios, acima de 3 a 9 mm (FM) e grandes, acima de 9 mm (FG).

Com o auxílio de pinça e gazes o ovário foi removido do Becker e colocado sobre uma placa de Petri para identificação dos folículos. A dimensão dos folículos foi aferida por meio de uma régua graduada em milímetro e confirmada por meio de paquímetro modelo 125 universal MTX®.

Aspiração Folicular: Conforme a dimensão folicular, o conteúdo aspirado foi armazenado em tubos Falcon® de 15 mL, identificados e colocados em banho-maria a 37°C. O material aspirado foi transferido para uma placa de Petri contendo PBS para visualização, seleção, classificação e contagem dos CCOs, os quais foram classificados como Grau I: cumulus compacto com mais de três camadas de células do cumulus; Grau II: células do cumulus parcialmente compactadas, com menos de três camadas; Grau III: apenas uma camada de células do cumulus, e Desnudo: ausência de células do cumulus, (BLONDIN & SIRARD, 1995; SIRARD ET al, 2006).

MIV: após a seleção dos complexos cumulus oócitos apenas os oócitos de Grau I e II foram utilizados e, acondicionados separadamente em microtubos com 40 µL de meio de maturação (apêndice A), sob 25 µL óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂, com a tampa lacrada por fita adesiva durante 24 horas dentro do transportador de oócitos (Fig.2).

Figura 2- Transportador de Oócitos- TREO® (WTA)

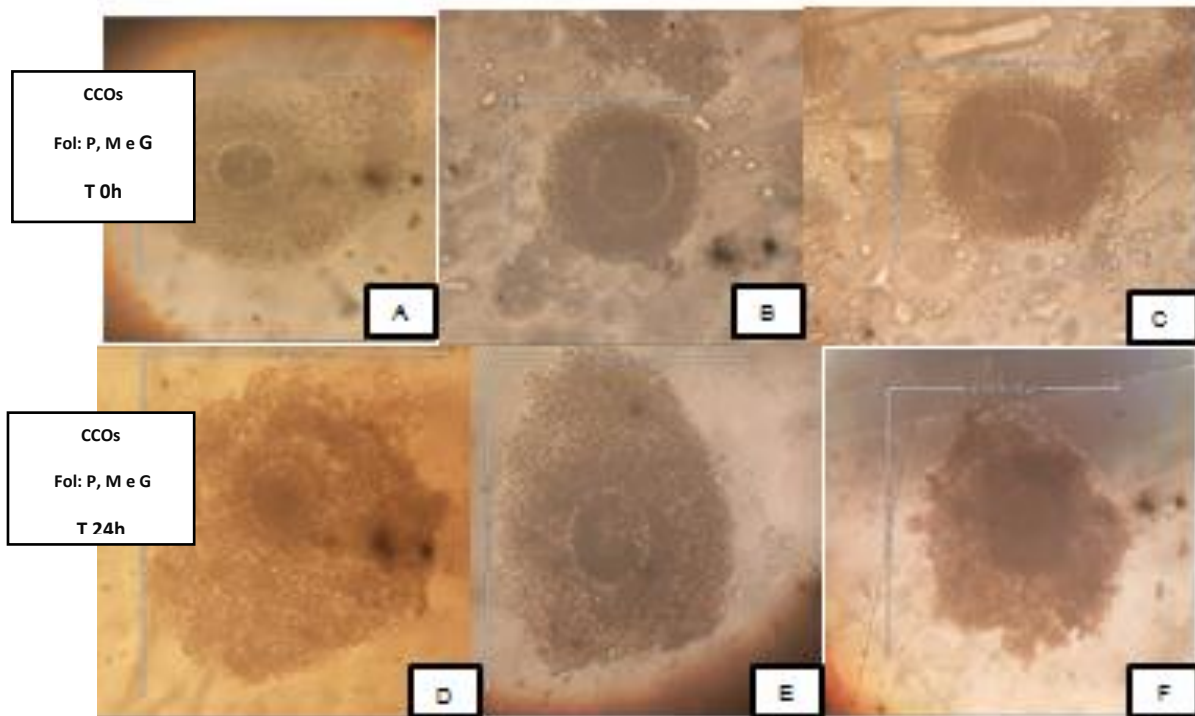


Fonte: Petry (2020)

Imagens e mensuração das células do *cumulus*: As dimensões das células do cúmulus foram determinadas durante a visualização das estruturas por estereomicroscopia (Lupa TIM-30®). Cada gota de maturação com CCOs foi fotografada por câmara - Samsung® A10; acoplado à Lupa TIM-30®, no momento pré MIV, ou seja, no tempo zero (T 0h) e no pós MIV (T 24 h). No momento pré MIV os oócitos foram fotografados e a área de cada CCOs foi mensurada com auxílio de régua graduada em milímetro e confirmada por meio de paquímetro, usando a objetiva da 2x da Lupa TIM-30.

Avaliação: As medidas realizadas nas imagens foram obtidas por meio do aplicativo ImagMeter , para o cálculo da área (Fig. 3).

Figura 3- Mensurações dos CCOs oriundos de folículos pequenos, médio e grandes



A: CCO, folículo pequeno < 3 mm (P) T 0h; **B:** CCO folículo médio, 3 a 9 mm (M) T 0h; **C:** CCO folículo grande > 9 mm (G) no T 0h, **D:** CCO folículo P, T 24 h. **E:** CCO folículo M, T 24h; **F:** CCO folículo G T 24 h. Fonte: Petry (2020).

As medidas dos CCOs, nos respectivos grupos, dentro de cada réplica encontram-se no Anexo II. Para a medida da expansão das células do *cumulus* aplicou-se o cálculo descrito por Daen et al (1994): área (mm²) = comprimento (mm) × largura (mm) × 0,7854. A área de expansão foi obtida por subtração da medida da área (T 0h) em relação à área pós- maturação (T 24 h), sendo submetida ao cálculo de porcentagem em relação à área pós- maturação.

4.3.2 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade, homogeneidade de variâncias e análise de resíduos, utilizando delineamento inteiramente casualizado e as médias confrontadas pelo teste F ou pelo teste Kruskal-Wallis no nível de 95% de confiabilidade.

Distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos foram obtidos para as medidas de expansão e porcentagem de expansão das células do cúmulus de CCOs nos respectivos grupos experimentais e representados por Split Splot.

4.4 Resultados e Discussão

A avaliação da maturação *in vitro* de CCOs provenientes de folículos de diferentes dimensões e obtidos a partir da aspiração da superfície de ovários com e sem corpo lúteo resultou em medidas das células do cúmulus pré e pós – maturação *in vitro* Anexo III. As medidas foram geradas a partir das imagens fotográficas dos CCOs, pré e pós- maturação *in vitro* (Anexo II).

As médias e a porcentagem de expansão das células do cumulus após a maturação dos CCOs *in vitro*, de acordo com as variáveis dimensões foliculares e presença ou ausência de corpo lúteo estão representadas na tabela 3 e nas figuras 4 a 8.

As células do cumulus são fundamentais para o processo de maturação e a sua expansão reflete a maturação atingida pelo oócito (RODRIGUES et al., 2019). Neste sentido, mensurações deste aporte celular podem ser usadas como ferramenta para comparação da resposta fisiológica de oócitos provenientes de folículos com dimensões variáveis, os quais fazem parte do desafio da OPU e, conseqüentemente, da maturação *in vitro*.

A otimização da OPU busca aproveitamento máximo do potencial ovariano, por meio da aspiração de folículos possivelmente visíveis na tela do monitor ultrassonográfico, embora, tais estruturas possam estar abaixo das dimensões foliculares usualmente aspiradas e estabelecidas como ideais (> 3 mm). No presente estudo, para oócitos oriundos de folículos < que 3 mm (grupo P) sem corpo lúteo, as

médias de expansão das células do cúmulus foram compatíveis com as médias da maturação de oócitos entre 3 e 9 mm (grupo M), como observado na tabela 3.

Apesar dos resultados promissores observados na tabela 3, quanto ao aproveitamento de oócitos oriundos de folículos menores que 3mm, estudos relatam que oócitos recuperados de folículos < 6mm apresentam distribuição irregular de grânulos corticais, sistema defeituoso de excitose, maiores anormalidades na fertilização e, portanto, não são capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário (Cran e Cheng, 1986; Hyttel et al., 1986; Shabankareh et al., 2015).

Tabela 3 - Médias e porcentagem média da expansão das células do cumulus em CCOs submetidos à maturação *in vitro*.

| Grupos | P CL - | P CL+ | M CL- | M CL+ | G CL- | G CL+ |
|---------------|------------|------------|--------------|------------|------------|------------|
| Médias | 170.186,80 | 181.094,06 | 202.636,7918 | 378.897,32 | 796.881,97 | 219.729,72 |
| % | 63% | 32% | 56% | 71% | 30% | 45% |

PCL-: CCOs obtidos a partir de folículos p em ovário sem CL; P CL+:CCOs de fol p em ovários com CL; MCL-: CCOs de fol M em ovários sem CL; MCL+: CCOs de fol M em ovários com CL; GCL-:CCOs de fol G em ovários sem CL; GCL+: CCOs de fol G em ovários com CL.

Quanto a influência de genes como H2A, FSHR, GHR na competência oocitária durante a maturação, o tamanho folicular, foi associado especificamente o gene H2A e a histona. Os oócitos recuperados de folículos < 6 mm apresentaram níveis mais baixos de H2A transcritos e histonas específicas de oócitos. Portanto, competência de desenvolvimento de oócitos foram comprometidos (CAIXETA et al., 2009) e apresentam atraso no desenvolvimento celular estágios de embriões (LEQUARRE et al., 2005).

O presente estudo reuniu dados dimensionais descritivos quanto a expansão das células do cumulus dos oócitos provenientes de folículos denominados P, M e G na presença ou ausência de CL os quais estão representados nas figuras 4 a 8.

Figura 4 - Distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da expansão das células do cumulus observadas nos CCOs obtidos a partir de folículos G, M e P.

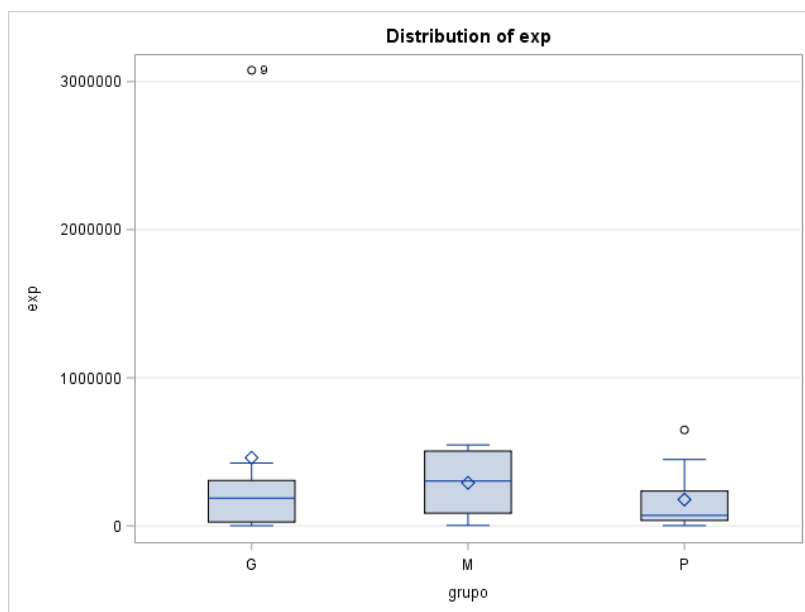


Figura 5 - Distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da porcentagem de expansão das células do cúmulus observadas nos CCOs obtidos a partir de folículos G, M e P.

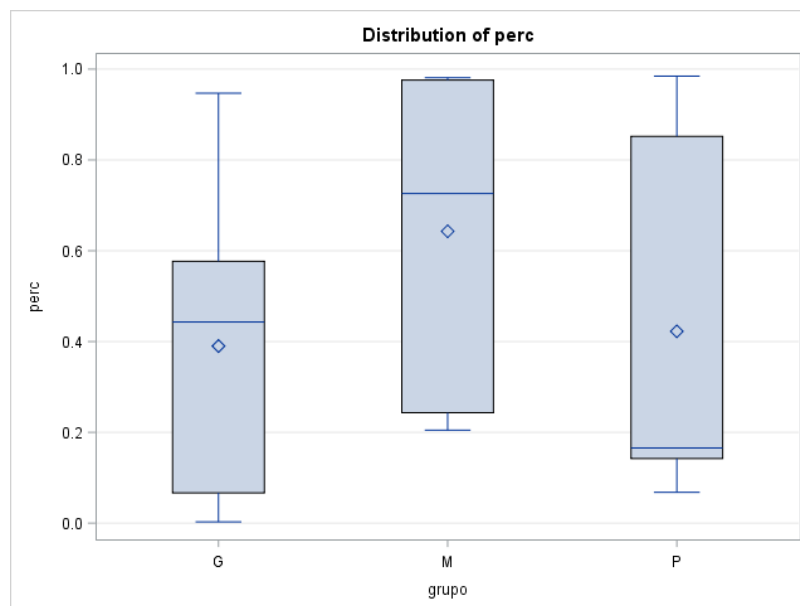
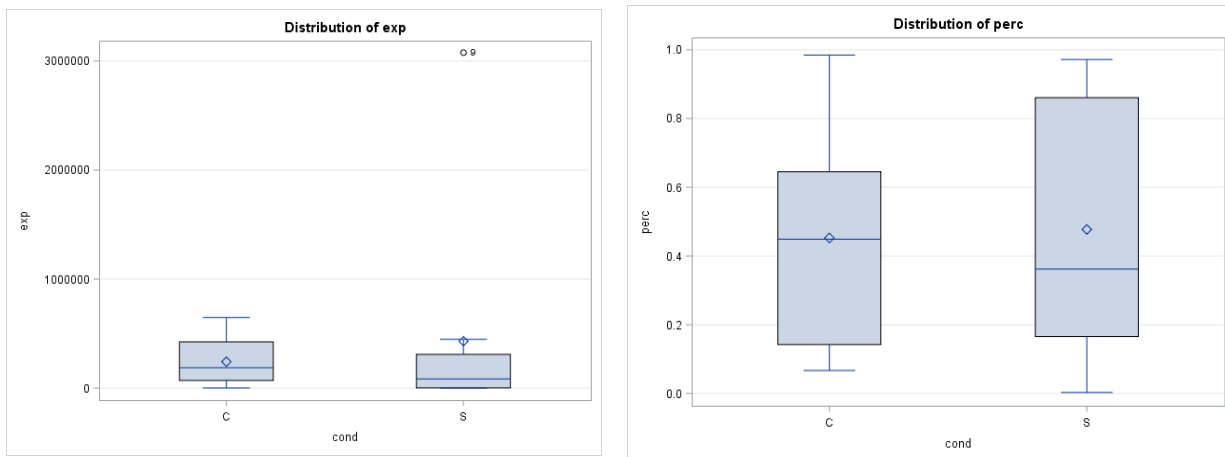


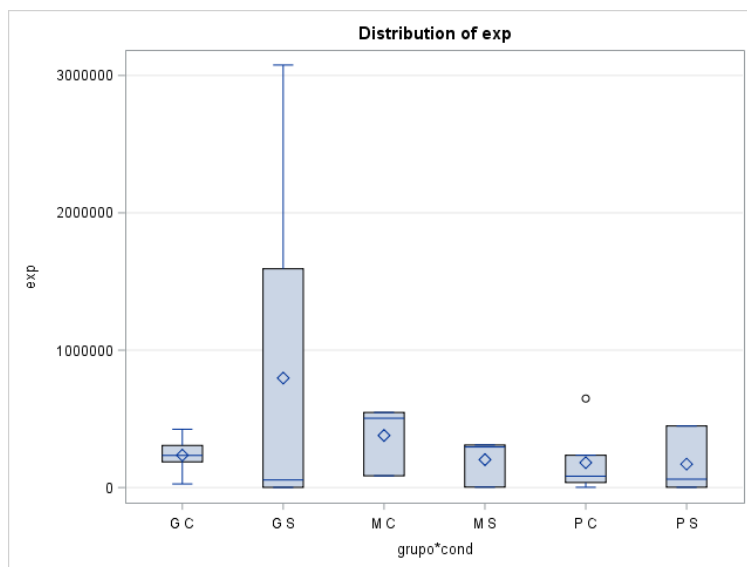
Figura 6 - Expansão e porcentagem de expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos em ovários com e sem corpo lúteo.



C: distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da expansão e porcentagem de expansão de CCOs em folículos provenientes de ovários com CL.

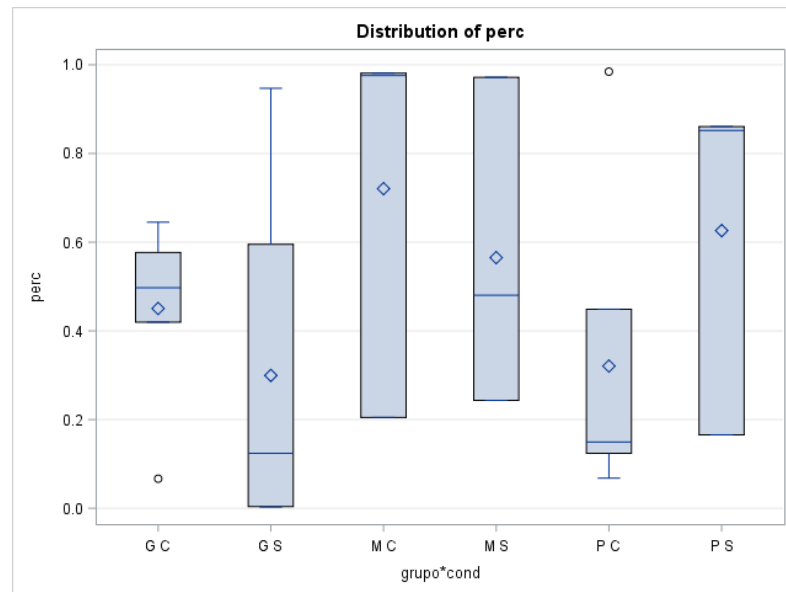
S: distribuição das médias, medianas, valores máximos e mínimos da expansão de CCOs em folículos provenientes de ovários sem CL.

Figura 7 - Expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos P, M e G em ovários com e sem corpo lúteo.



GC: CCOs de Fol G em ovários com CL; GS: CCOs de Fol G em ovários sem CL; MC: CCOs de Fol M em ovários com CL; MS: CCOs de Fol M em ovários sem CL; PC: CCOs de Fol P em ovários com CL; OS: CCOs de Fol P em ovários sem CL

Figura 8 - Porcentagem de expansão das células do cúmulus em CCOs obtidos a partir de folículos P, M e G em ovários com e sem corpo lúteo



GC: CCOs de Fol G em ovários com CL; GS: CCOs de Fol G em ovários sem CL; MC: CCOs de Fol M em ovários com CL; MS: CCOs de Fol M em ovários sem CL; PC: CCOs de Fol P em ovários com CL; OS: CCOs de Fol P em ovários sem CL.

A presença do corpo lúteo limita as aspirações por risco do excesso de coagulação no fluido aspirado, uma vez que a estrutura ricamente vascularizada pode ser atingida pela agulha acoplada ao transdutor. No entanto, a aspiração de folículos *in vitro* nos ovários de abatedouro com CL, mostrou-se inócua quanto ao potencial de maturação. A maior porcentagem de expansão média (71%) foi obtida no grupo M com CL (Fig 9), indicando que a presença desta estrutura não interferiu negativamente na maturação dos oócitos, mas sim proporcionou um ambiente favorável à mesma, possivelmente pelo incremento em hormônios esteróides como a progesterona e estrógeno, presentes em fêmeas comprovadamente cíclicas pela presença de corpo lúteo no ovário.

No entanto, folículos < 3mm (grupo P) apresentaram porcentagem média de maturação relativamente baixa quando comparada aos demais grupos, na presença do corpo lúteo (Fig.8). Fato que pode ser explicado pela fisiologia da dinâmica de crescimento folicular e hormônios envolvidos em cada fase. A capacidade dos oócitos para maturação e fertilização *in vitro* até estágios embrionários avançados são conhecidos por serem diretamente influenciados pelo tamanho do folículo, a partir do qual os oócitos foram obtidos na OPU.

Os oócitos recuperados a partir de folículos ≥ 6 mm apresentaram melhores resultados em termos de qualidade e competência de desenvolvimento *in vitro* (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994). As variações nas dimensões foliculares levam às diferentes respostas *in vitro* quanto às competências de maturação e desenvolvimento (HENDRIKSEN et al., 2000). Assim, o tamanho dos folículos dos quais os oócitos são recuperados é um fator chave para taxas de PIVE (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; CROZET et al., 1995; CAIXETA et al., 2009).

Acredita-se que o mecanismo pelo qual o rendimento de blastocisto é menor em oócitos maturados submetidos à PIVE e provenientes de folículos pequenos, seria pelo atraso na cavitação embrionária e nos estágios de crescimento, os quais mostram-se retardados dentro do ciclo celular (LEQUARRE et al., 2005).

Outros autores elucidaram mecanismos relacionados às ondas de crescimento folicular, as quais possuem fases distintas (recrutamento, divergência e dominância), sendo a fase de recrutamento e possivelmente o final da fase de regressão de folículos dominantes que não ovulam, correspondentes à presença de folículos < 3 mm (GINTHER et al., 2000).

Ainda seguindo esta linha de raciocínio, durante o diestro, com a presença do CL, a progesterona predomina em relação ao estrógeno, o qual é fundamental para os fatores que sinalizam o início da maturação (COUTINHO et al., 2007). Neste caso, a relação estrógeno: progesterona influencia no processo de regressão e atresia folicular, podendo agir negativamente na maturação, estando esses folículos menores (fol < 3 mm) quando aspirados, já em processo de atresia e programados para a morte celular, caracterizada pela apoptose.

Observou-se que oócitos obtidos a partir da aspiração de folículos < 3 mm na presença de CL apresentaram as porcentagens mais baixas de expansão (Fig 8), podendo esta estrutura, não apenas limitar fisicamente a aspiração pelo risco da alta perfusão, como indicar maior possibilidade de folículos atrésicos e com menor potencial de expansão. No entanto, na ausência de CL, folículos < 3 mm apresentaram expansão compatível com aqueles oriundos de folículos médios (Fig 9), possivelmente pela favorável relação Estrógeno: Progesterona, na qual fatores estrógeno dependentes estariam presentes nesses folículos contribuindo para o potencial de maturação apesar da baixa dimensão folicular.

Como esperado, oócitos obtidos a partir de folículos > 9 mm apresentaram baixo potencial de expansão, independente da presença ou ausência de corpo lúteo

(Tabela 3). A distribuição de valores máximos e mínimos, da porcentagem de expansão neste grupo (GC) está também representada na Fig.8. Oócitos inclusos nesta categoria folicular encontram-se em processo de maturação quando aspirados, e a continuidade do mesmo *in vitro* parece ser limitada pela ativação prévia de fatores envolvidos na maturação fisiológica, os quais não são competentes à continuidade do processo *in vitro*. No entanto, na minoria de oócitos dentro desta categoria, os quais apresentaram maturação, observa-se grande diferença na mensuração da expansão das células do cúmlus na presença ou ausência de CL.

A relação Estrógeno: Progesterona influencia diretamente no crescimento folicular e no potencial de maturação do oócitos, o que fica claro neste caso. A expansão média dos CCOs de folículos > 9 mm foi superior na ausência de CL quando comparada à medida obtida na presença de CL, embora a porcentagem representada por ambas foi baixa e ficou entre 30 e 40%, respectivamente, na ausência e presença de CL (Tabela 3 e Fig 7).

Este achado reflete o potencial de crescimento folicular na presença de estrógeno durante a fase de dominância, embora com baixas taxas de maturação oocitária *in vitro*, principalmente na ausência de CL, acompanhada por já estabelecida maturação fisiológica na fase pré- ovulatória.

4.5 Conclusão

Na ausência de CL, complexos cumulus oócitos oriundos de folículos < 3mm apresentaram expansão compatível com àqueles de folículos médios, os quais normalmente são aspirados nos procedimentos à campo. Este achado indica o potencial para a aspiração de folículos menores subutilizados e aumento do número de oócitos obtidos por sessão de aspiração, podendo aumentar, conseqüentemente, os índices de PIVE. A demonstração dos resultados da PIVE com a utilização de tais oócitos provenientes de folículos menores em raças zebuínas e raças resultantes de cruzamentos é escassa e deve ser investigada.

Oócitos provenientes de folículos grandes apresentaram taxas mais baixas de maturação, independente da presença ou ausência de CL, portanto, confirma-se a manutenção do critério de exclusão dos mesmos para a OPU na PIVE.

5. EXPERIMENTO II

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NELORE E GREYMAN

5.1 Hipótese

A performance reprodutiva de doadoras da raça Greyman, associada à adaptação às condições da região Norte do Brasil resultará em produção *in vitro* de embriões satisfatória, quando comparada à raça Nelore.

5.2 Objetivo geral

Comparar os índices do processo da PIVE em vacas doadoras das raças Greyman e Nelore

5.2.1 Objetivos Específicos

Determinar e comparar os índices da PIVE (número de oócitos viáveis obtidos na OPU, taxa de clivagem embrionária, blastocistos, blastocistos transferidos e prenhez) em doadoras Greyman e Nelore.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Local

A produção de embriões *in vitro* foi realizada no Laboratório EmbryoFiv (Fig. 09) localizado na chácara Pato Branco, situada no Município de Colorado do Oeste-RO.

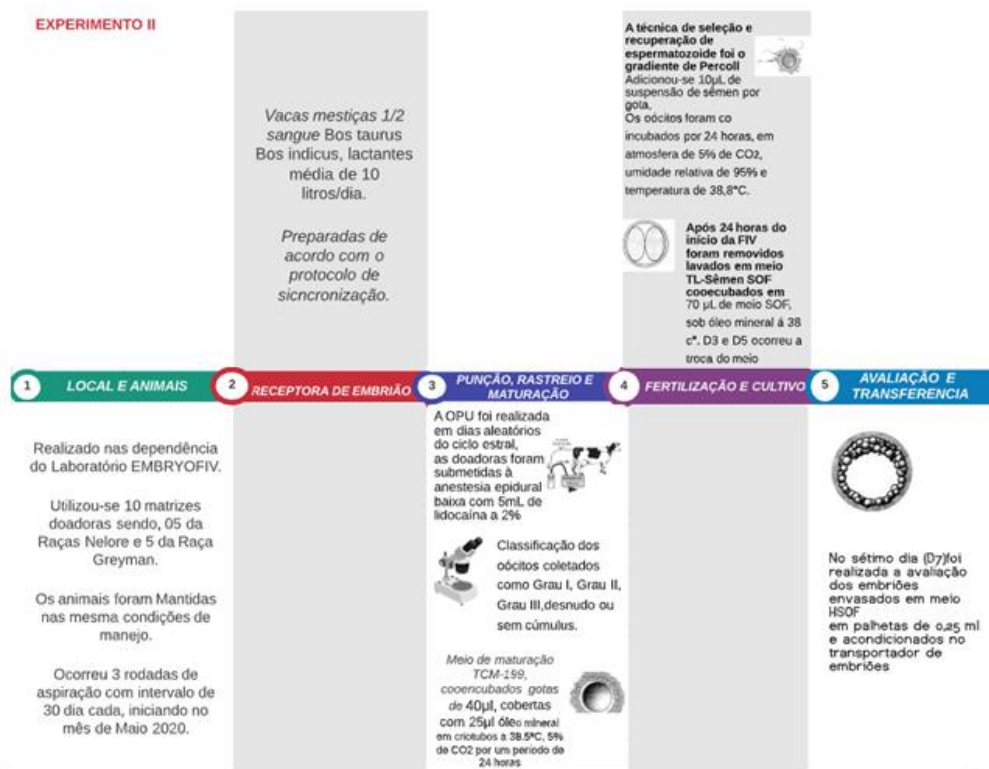
Figura 9 - EmbryoFiv Fertilização In Vitro



Fonte: www.googlemaps.com 2020

Os procedimentos realizados desde a aspiração até a obtenção de embriões aptos à inovulação estão representados na linha do tempo da Figura 10, a seguir.

Figura 10 - Organograma dos procedimentos para a PIVE – Exp 2. II



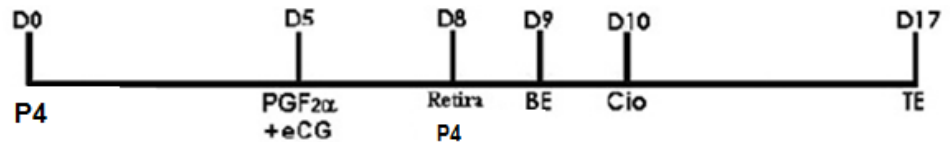
1: Experimento realizado durante o mês de maio no laboratório Embryofiv, dez vacas 10 doadoras, sendo 5 da raça Greyman e 5 da raça Nelore foram submetidas a OPU. **2:** Vacas mestiças ½ sangue *Bos taurus* *Bos indicus* foram utilizadas como receptoras de embrião. **3:** OPU realizada em dias aleatórios do ciclo estral, CCOs classificados em Grau I, Grau II, Grau III e Desnudo. O meio de maturação utilizado foi TCM-199, os oócitos foram acondicionados em gotas de 40 µL de meio de maturação (apêndice A) sob 25 µL óleo mineral, incubados à 38,5°C por 24 horas. **4:** Para fertilização utilizou-se sêmen convencional (gradiente de percoll, 10 µL de sêmen em cada gota) seguindo-se a incubação das gotas de fertilização por 24 horas. Após 24 horas, zigotos foram lavados com meio SOF e incubados em 40 µL de meio de maturação (apêndice A) sob 25 µL óleo mineral, incubados à 38,5°C por 24 horas. No terceiro e quinto dia ocorreu a troca do meio (feeding), **5:** Avaliação e seleção de embriões considerados morfológicamente aceitáveis para o envase no sétimo dia. Blastocistos selecionados envasados em HSOF dentro de palhetas de 0,25 mL e colocados no transportador até o local de inovulação.

5.3.2 Animais

Foram utilizadas como doadoras de embrião, cinco (n=5) vacas da raça meio sangue Greyman e cinco (n=5) vacas da raça Nelore Puro de Origem (PO), às quais foram submetidas às mesmas condições de manejo. Para inovulação dos embriões PIVE foram utilizadas vacas receptoras mestiças (½ sangue *Bos taurus* x ½ sangue *Bos indicus*), lactantes (média de 10 litros de leite/dia em sistema integrado pasto e

suplementação com concentrado, sal mineral e água em bebedouro tipo australiano) com até dois partos. Vacas doadoras foram preparadas de acordo com o protocolo hormonal de sincronização descrito a seguir (Figura 11).

Figura 11 - Protocolo de sincronização hormonal das vacas receptoras de embrião



Fonte: Arquivo permanente Embryofiv, 2020.

A sincronização foi iniciada no dia D0, no qual foi inserido um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (P4) (Sicrogestc®, Ourofino, Brasil) e aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE - Estrogin®). No quinto dia (D5) ocorreu, concomitantemente, a aplicação intramuscular de 200UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), (Folligon®, Intervt, Brasil). No oitavo dia (D8) o dispositivo de P4 foi retirado e procedida a aplicação via intramuscular de 500µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino, Brasil) e no nono dia (D9) a administração de 1mg de benzoato de estradiol (BE - Estrogin®), via intramuscular. No D17 ocorreu a inovulação dos Embriões PIVE.

5.3.3 Punção Folicular Guiada por Ultrassonografia (OPU)

A OPU foi realizada em dias aleatórios do ciclo estral, com intervalo de 30 dias, sendo realizada a primeira aspiração no mês de maio. Para o procedimento de aspiração, as doadoras foram submetidas à anestesia epidural baixa com 5mL de lidocaína a 2% (Anestxt®, Vetoquinol, Brasil), entre a primeira e segunda vértebra coccígea e higienizadas na região perineal após relaxamento da cauda.

Os oócitos foram coletados por meio da OPU, com aparelho portátil de ultrassom (Mindray® DP 2200 VET – Mindray, LTD, Tóquio, Japão) equipado com transdutor endocavitário microconvexo de 5,0 MHz. Este aparelho foi adaptado a uma guia de biópsia para aspiração folicular conectado a agulha descartável de 18G e linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento (WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) conectadas a um tubo cônico de 50 mL para coleta dos oócitos.

O sistema de aspiração foi acoplado à bomba de vácuo (BV 003d – WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) portátil, ajustada e regulada com pressão negativa de 68 mmHg (12 a 15 mL de água/minuto; KRUIP et al., 1994). O meio de aspiração utilizado para lubrificação e lavagem do sistema de OPU e para o recebimento dos oócitos no tubo de coleta foi PBS, mantidos a aproximadamente 37° C.

5.3.4 Rastreamento e Maturação *in vitro* (MIV)

O fluido obtido por punção folicular foi transferido para a sala de rastreamento, em um tubo falcon protegido de luz solar. Após filtrado, o conteúdo foi transferido para uma placa de petri (uma placa por animal) e o rastreador fez a observação e classificação dos oócitos coletados como Grau I, Grau II, Grau III, desnudo ou sem cumulus.

Para o presente experimento foram utilizados CCOs de GRAU I, II e III, sendo os mesmos transferidos para gotas de 60 µL de meio de lavagem e acondicionados em criotubos contendo 25µL meio de maturação (apêndice A) e 40µL de óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ com a tampa lacrada, mantidos no transportador de oócitos (Treo® WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) até o final da OPU. Então, sendo colocados na incubadora (Thermo®) a 38,8 °C, por 24 horas, com a tampa semi aberta para o término da maturação.

5.3.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após a maturação, os oócitos foram lavados duas vezes em meio FIV (Apêndice B) para remoção do meio MIV, em seguida foram transferidos para gota de 70 µL de meio FIV, sob óleo mineral. Foi usado sêmen convencional do mesmo touro para as respectivas raças. O sêmen foi descongelado em água a 36 °C, por 30 segundos. A técnica de seleção e recuperação de espermatozoide foi o gradiente de Percoll (Apêndice C) 45% e 90%, equilibrada em solução 10x concentrada.

Após a recuperação dos espermatozoides, os mesmos foram concentrados em 30 µL do sedimento selecionado pelo Percoll e colocados em microcubo (eppendorf) contendo 30 µL de meio FIV gota pré-equilibrada. Adicionou-se 10µL de suspensão de sêmen por gota, tendo um total de aproximadamente 90 milhões de espermatozoides por gota. Os oócitos foram co incubados por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,8°C.

5.3.6 Cultivo *in vitro* (CIV) / “Feeding” e avaliação da taxa de clivagem

Após 24 horas do início da FIV, os zigotos foram removidos da gota FIV e lavados em meio TL-Sêmen (Apêndice D), sendo submetidos às sucessivas pipetagens para remoção das células do cumulus. Depois os mesmos foram lavados em meio de desenvolvimento SOF (Apêndice E), no qual foram transferidos para gota de 70 µL de meio SOF, sob óleo mineral. No terceiro dia (D3) e no quinto dia (D5) ocorreu avaliação da clivagem e a troca de meio, sendo retirados 30 µL de cada gota e acrescentado 30 µL. As estruturas foram então incubadas por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,8°C.

5.3.7 Avaliação da taxa de blastocistos e inovulação de embriões

No sétimo dia (D7) foi realizada a avaliação dos embriões e aqueles selecionados considerados de boa qualidade por meio de avaliação morfológica, segundo as recomendações da IETS (International Embryo Technology Society), foram então envasados em meio HSOF (Apêndice F), em palhetas de 0,25 mL e acondicionados no transportador de embriões (TREQ® - WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) até a chegada ao local da inovulação nas vacas receptoras previamente sincronizadas. A inovulação de embriões ocorreu em três fazendas localizadas no município de Colorado do Oeste-RO.

No decimo sétimo dia D17, as respectivas receptoras tiveram seus ovários avaliados por meio de ultrassonografia para verificação para presença do CL. As vacas que apresentaram o CL receberam anestesia com 5ml de cloridrato de Lidocaína 2% (Anestxt®, Vetoquinol, Brasil), na região epidural, entre a primeira e segunda vértebra coccígea. Em seguida, houve a higienização da vulva com água corrente e seca com papel toalha. O inovulador com a bainha e a palheta contendo o embrião foi levado à porção cranial do corno ipsilateral ao corpo lúteo, onde o embrião foi depositado.

5.3.8 Diagnóstico Gestacional (DG)

Após 30 dias da data da inovulação dos embriões PIVE, o diagnóstico foi realizado por meio de ultrassonografia trans- retal (Mindray® DP 2200 VET – Mindray,

LTD, Tóquio, Japão). Aos 60 dias ocorreu o segundo diagnóstico para confirmação da prenhez final (DGF).

5.4 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade, homogeneidade de variâncias e análise de resíduos e por meio de delineamento inteiramente casualizado e as médias foram confrontadas pelo teste F ou pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 95% de confiabilidade.

5.5 Resultados e Discussões

Experimento II

O rendimento da OPU mostrou-se superior em vacas Nelore comparado às Greyman, considerando o número médio de CCOs totais e viáveis (Tabela 4). No entanto, a porcentagem de oócitos viáveis obtidos em ambas as raças esteve acima de 80% e os inviáveis (desnudos), abaixo de 20%.

Tabela 4 - Número médio e classificação de CCOs obtidos na OPU de vacas Nelore Greyman.

| Doadoras | Média de Oócitos (%) | Classificação de oócitos viáveis (%) | | | | |
|----------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Desnudos | Viáveis | Grau I | Grau II | Grau III |
| Nelore | 202,6 | 34,3 ± 1,8 (17%) | 168,3 ± 2,05 (83%) | (44%) | (41%) | (15%) |
| Greyman | 101,6 | 21,6 ± 2,5 (19%) | 89,0 ± 7,25 (81%) | 30 (34%) | 39 (43%) | 21 (23%) |

Dentre os CCOs viáveis, observa-se que a classificação para ambas as raças é compatível, predominando oócitos Grau I e II em maior porcentagem, o que reflete nas taxas de clivagem e êxito no desenvolvimento embrionário.

A média de CCOs obtida considerando ambas as raças, assim como o número total de oócitos e porcentagem de estruturas viáveis e inviáveis obtidos por OPU para a PIVE estão representadas na tabela 5. O número superior de oócitos viáveis em

relação aos inviáveis pode ser observado, com a respectiva porcentagem para cada raça (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação dos complexos cumulus oócitos em vacas Nelore e Greyman submetidas à OPU

| | Totais | Oócitos Inviáveis | Oócitos Viáveis |
|--|--------|-------------------|-----------------|
| Média de oócitos obtidos na OPU por Réplica | 157 | 28 | 129 |
| N | | | |
| Oócitos totais | 940 | 168 | 772 |
| (%) | | 18% | 82% |

A porcentagem de oócitos viáveis para a raça Nelore foi superior quando comparado àqueles obtidos na OPU da raça Greyman. No entanto, apenas oócitos selecionados como Grau I e II foram submetidos à PIVE para ambas as raças, resultando em porcentagens não significativamente diferentes, como taxa de blastocistos e blastocistos selecionados para inovulação, o que revela a eficiência da PIVE na raça Greyman, assim como compatibilidade com os resultados obtidos na raça Nelore.

O desempenho de vacas doadoras *Bos indicus* (Brahman, n= 161) vs *Bos taurus* (Angus e Simental n= 167) foi comparado quanto a produção oocitária demonstrando superioridade no *indicus versus taurus*, respectivamente (n= 2556) vc (n= 1903), p=0,08; assim como na qualidade morfológica dos oócitos Grau I e Grau II obtidos das respectivas raças: (n = 689 vs. 444 para COCs grau I, P < 0,0001; n = 681 vs. 509 para COCs grau II, P = 0,010, para doadoras zebu e taurina, respectivamente) (Guimarães et al, 2020).

Os achados acima justificam a influência positiva do *Bos indicus* na composição da raça Greyman, apesar do menor número de animais utilizados no presente experimento, no qual as diferenças quanto à morfologia, não se fazem presentes (Tabela 4). O número de CCOs viáveis obtidos na OPU em vacas doadoras da raça Nelore e da raça Greyman, assim como os índices da PIVE em cada réplica para cada raça estão representados no Anexo 5.

Os índices da PIVE para vacas das raças Nelore e Greyman estão dentro da média esperada nas rotinas de laboratórios comerciais e de centros de pesquisa, nos quais buscam manter a produção de blastocistos acima de 40%, sendo aceitáveis valores pelo menos superiores a 35%. Embora o número de oócitos obtidos na OPU das vacas Greyman tenha sido inferior quando comparado ao número obtido nas vacas Nelore, a taxa de clivagem ficou acima de 70%.

Este resultado indica bom potencial nas clivagens iniciais, podendo ser atribuído ao rastreamento eficaz e seleção de oócitos de ótima qualidade, além do bom desempenho da raça na produção *in vitro* de embriões dentro dos protocolos usuais adotados pelo laboratório. A produção de embriões em determinadas raças pode apresentar variações diante de determinados protocolos utilizados, influenciados pelos meios de maturação, fertilização e cultivo. A escolha do sêmen em certos acasalamentos nem sempre é compatível com razoáveis índices da PIVE, muitas vezes exigindo substituição do sêmen em casos de baixas taxas de produção embrionária.

Nas demais fases, o desenvolvimento embrionário em ambas as raças é compatível, estando os índices médios, muito próximos na fase final de blastocisto viável para inovulação. No entanto, as taxas de prenhez pós inovulação, mostram superioridade para embriões PIVE da raça Nelore. Fatores relacionados às receptoras, como nutrição, sanidade e condição corporal podem influenciar diretamente nos resultados da prenhez.

Valores médios para oócitos submetidos à maturação, blastocisto e, desenvolvimento e blastocistos viáveis para inovulação, assim como taxa de prenhez estão representados na tabela 6.

Tabela 6 - índices da PIVE e taxas de prenhez em vacas Nelore e Greyman.

| Parâmetros (%) | Raça / Média e Desvio Padrão ¹ | | | | | | | | |
|----------------|---|----|---|---|--------|----|---|---|---|
| | Greyman | | | | Nelore | | | | |
| Oócitos | Viáveis | 78 | ± | 0 | B | 83 | ± | 0 | A |
| | Inviáveis | 22 | ± | 0 | B | 17 | ± | 0 | A |
| Blastocistos | | 52 | ± | 0 | A | 47 | ± | 0 | A |
| Transferidos | | 49 | ± | 0 | A | 42 | ± | 0 | A |
| Prenhez DGI | | 61 | ± | 0 | B | 45 | ± | 0 | A |

Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem $p < 0.05$.

Tabela 7- Índices da PIVE e taxas de prenhez obtidos em vacas Nelore e Greyman

| Doadoras | Oócitos Viáveis | Clivagem Mórulas | BL inicial | BL Transf | N prenhez |
|----------|-----------------|------------------|---------------|-------------|-------------|
| Nelore | 166 | N= 90 54,2% | N=70 42,1% | N=68 41% | N=41 60% |
| Greyman | 89 | N= 64 72% | N= 41 46% | N=38 43% | N=18 47% |

Ao comparar a PIVE para doadoras zebuínas e taurinas Guimarães et al; (2020) determinaram a superioridade para doadoras zebuínas quanto a porcentagem de mórulas (44% zebuínas e 64,2% taurinas, $P = 0,017$) e blastocistos expandidos (81,43% zebuínas e 75,13% taurinas, $P < 0,0001$). Este achado indiretamente favorece a performance reprodutiva da raça Greyman na PIVE, considerando sua composição *Bos indicus* aliada ao potencial promissor da raça quanto às características produtivas agregadas à composição genética do *Bos taurus*. A investigação quanto a influência na performance reprodutiva, com ênfase na PIVE das demais variações de grau sanguíneo do Greyman se faz necessária, e contribuirá para a pecuária na região estudada. Estudos estão sendo iniciados neste sentido para esclarecer as variações possivelmente encontradas de acordo com o grau de sangue taurus (Murray Gray) introduzido na base índicus (Bhraman e Nelore).

5.6. CONCLUSÃO EXPERIMENTO II

Os índices da PIVE obtidos a partir de vacas doadoras da raça Greyman mostraram-se aceitáveis quando comparados aos índices de vacas doadoras da raça

Nelore. O rendimento da OPU nas vacas Greyman não foi eficiente como nas vacas Nelore, com números menores.

A menor disponibilidade em pastagens em determinadas fases do ano pode afetar diretamente a condição reprodutiva, ciclicidade da fêmea e conseqüentemente limitar o rendimento da OPU. O período de adaptação de novas raças introduzidas em determinada região, pode resultar em variações mais frequentes quanto aos índices apresentados, com a necessidade de correção de fatores relacionados ao manejo nutricional e reprodutivo, além das condições de ambiência e bem - estar.

O rendimento da OPU também apresenta uma forte relação com a raça, sendo superior em zebuínos quando comparados aos taurinos, embora a Greyman tenha na sua composição genética, a influência da raça zebuína, neste caso a raça Brahma. Nota-se que os resultado da OPU obtidos desta raça foram próximos aos índices encontrados em raças taurinas. Fato que pode ser compensado com aspirações mais frequentes para obtenção do número proposto de embriões PIV dentro de determinado período na estação de monta definida.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao abatedouro Almeida, pelo fornecimento dos ovários e ao médico veterinário Dr. Flebson Montalvão de Almeida, responsável pelo serviço de Inspeção Municipal (S.I.M), os quais colaboraram para a realização do experimento I. Agradecemos especialmente a execução, colaboração, financiamento e supervisão do médico veterinário Wilian Boni e ao laboratório de Produção *in vitro* de embriões Embryofiv, Colorado do Oeste, Rondônia.

REFERÊNCIAS

- ABCZ. 2014. **Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos**. Controle de Desenvolvimento Ponderal. Associação Brasileira de Criadores de Zebu, Uberaba.
- AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. **Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows**. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.390-396, 2002.
- AKINPELUMI, O.P.; ORJI, B.I. **Gross morphological and morphometric changes in ovaries of cycling white Fulani cows – Bos indicus**. *Bulletin Animal Helth*, v.38, n.4, p.431-436, 1990.
- BAGG, M. A.; NOTTLE, M. B.; ARMSTRONG, D. T.; GRUPEN, C. G. **Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus–oocyte complexes during IVM**. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, p. 796-804, 2009
- BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. **Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31,n.2, p.205-211. 2007
- BARUSELLI, P.S., Sá Filho, M.F., Martins & C.M., Nasser, L.F. **and embryo transfer in Bos indicus cattle**. *Theriogenology*, 65, 77-88, 2006.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. **Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore.**

Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.2, p.276- 283, 2003

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. **Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, v.43, p.543-547, 1990.**

CAETANO E CAETANO Jr. Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas. **PubVet**, v.9, p. 381-393, 2015. **Caetano JPJ.**

CAIXETA ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MAN. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental. competence. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(5):655-64. <http://dx.doi.org/10.1071/RD08201>.PMid:19486602.

CARVALHO J. B. P.; CARVALHO,N. A. T.; REIS, E. L. et al. **Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. v. 69, p. 167–175, 2008.**

CRAN D, Cheng WTK. **The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization.** *Gamete Res*. 1986;13(3):241-51.

<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1120130307>.

CROZET N, Ahmed-Ali M, Dubos M. **Developmental competence of goat oocytes from follicles of diferente size categories following maturation, fertilization and culture in vitro.** *J Reprod Fertil*. 1995;103(2):293- 8.

<http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1030293>. PMid:7616502.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S. et al. **Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

COUTINHO, G.T.R.M.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F. et al. **Avaliação ultrasonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzará.** *Arquivo*

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, n.5, p.1089-1096, 2007.

DAEN FP, Sato E, Naito K, Toyoda Y (1994): **The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pro nucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro.** Journal of Reproduction and Fertility, 101, 667–673.

EUROPEAN Food Safety Authority (EFSA). **Scientific opinion. Statement on the use of animal-based parameters to assess the welfare of animals.** EFSA Journal 2012;10:2767. [8] DISPONÍVEL em :<<http://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>>. Acesso em: 24 de abril. 2020

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. **Differential responses of bovine oocytes and preimplantation to heat shock.** Molecular Reproduction and Development, v.46, p.138-145, 1997.

EPPIG, J. J. **Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*.** Biology of Reproduction, v.23, p.545-552, 1982.

ERICKSON BH. 1966. **Desenvolvimento e senescência do ovário bovino po-s-natal,** J Anim Sci, 25:800-805.

EVANS ACO, Adams GP, Rawlings NC. 1994. **O desenvolvimento folicular e a terapia hormonal em novilhas a partir de 2 a 36 semanas de idade.** J Reprod Fertil.

FERREIRA MBD. Obtenção de oócitos e produção in vitro de embriões em doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*). Jaboticabal: 2011. 176f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2011 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x/pdf>>.

Acesso em: 22 out. 2019.doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x.

FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. **Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrus cycle and pregnancy.** Theriogenology, v.45, n.7, p.1295-1325, 1996.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. et al. **Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle.** Theriogenology, v.47, p.1489-1505, 1997.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. **Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of *cumulus* cell.** Biology of Reproduction, Champaign, v.22, p.669-673, 1980

Galli, C. & Lazzari, G. 2000. **Practical aspects of IVM/IVF in cattle.** Journal of Reproduction Science, 42, 371-379.

GUIMARÃES, Anita Soares Barbosa. **In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos.** . Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., Salvador, v.21, 01 - 11, e21200142020, 2020. GINTHER JO, Knopf L, Kastelic JP. 1989. **associações temporais entre eventos ovarianos em gado durante os ciclos estrais com duas ou três ondas foliculares.** J Reprod Fert, V.87, p.223-230.

GINTHER JO, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. **A seleção do folículo dominante em bovinos.** Biol Reprod, 55

GONÇALVES, B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

Gonçalves, P. B. D., Visintin, J. A., Oliveira, M. A. L., Montagner, M. M. & Costa, L. F. S. 2002. **Produção in vitro de embriões.** In: Gonçalves, P. B. D., R., F. J. & Freitas, V. J. F. (eds.) Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Roca, São Paulo, Brasil.

Hafez, B. & Hafez, E. 2004. **Reprodução Animal.** Manole: São Paulo, Brasil.

HENDRIKSEN PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. **Effect of different stages of follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes.** Theriogenology, v.61, p.909-920, 2004.

Hendriksen P, Vos P, Steenweg W, Bevers M, Dieleman S. **Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes.**

Theriogenology. 2000;53(1):11-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00236-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00236-8). PMID:10735058.

Hyttel P, Xu K, Smith S, Greve T. **Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle.** J Reprod Fertil. 1986;78(2):615-25. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0780615>. PMID:3806520.

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.; MURPHEE, R.L.; COULSON, P.B. **Accuracy of predicting stages of bovine estrus cycle by gross appearance of the corpus luteum.** Journal of Dairy Science, v.63, n.1, p.155-160, 1980.

IRELAND et al., **Antral follicle count reliably predicts number of morphological healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle.** *Biology of Reproduction*, v.79,p.1219-1225, 2008.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. **Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle.,** *Biology of Reproduction* v.80, p.1272-1281, 2009. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/80/6/1272.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 nov. 2019. doi:10.1095/biolreprod.108.075093.

Kastelic JP. 1994. **desenvolvimento folicular ovariano Entendimento em bovinos.** Vet Med, 6: 64-71.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. **Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers.** *Theriogenology*, v.33, p.1269-1278, 1990.

LEQUARRE AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiès-Tran R, Callesen H, Mermillod P. **Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine.** *Theriogenology*.

2005;63(3):841-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>.
PMid:15629802

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. **Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro***. Journal of Animal Science, v. 48, p. 76-86, 1979.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J. **Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment alter fertilization and the implications for blastocyst quality**. Reproduction, v.126, p.333-346, 2003

LONERGAN P, Monaghan P, Rizos D, Boland M, Gordon I. **Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro**. Mol Reprod Dev. 1994;37(1):48-53. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080370107>. PMid:8129930.

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

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. **Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle**. Theriogenology, v. 45, n. 4, p. 801-810, 1996.

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

MARTINEZ MF, SANDERSON N, QUIRKE LD, Lawrence SB, Juengel JL. **Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system**. Theriogenology, v.85, n.3, p.466-475, 2016.

MENDONÇA HGR, Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Blaschi W, Morotti F, Moraes FLZ, Seneda MM. **Pregnancy rates following FTAI of Nelore heifers (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. Anim Reprod**, v.10, p.452, 2013. (Resumo).

MERTON JS, De Roos AP, Mullaart E, De Ruigh, L, Kaal, L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-74, 2003.

MODINA, LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. **Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s).** *Biology of Reproduction*, v.85, p. 1252-1259, 2011.

MOSSA, F. et al. **Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows.** *Journal of Dairy Science*, v.95, p.2355-2361, 2020 5FS. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212002032>>. Acesso em: 06 nov. 2019.doi: 10.3168/jds.2011-4325

MOROTTI, F. et al. **Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle?** *Animal Reproduction, Belo Horizonte*, v. 12, n. 3, p. 479–486, jul./sept. 2015.

NASCIMENTO, G.V.; Cardoso, e.a.; Batista, n.l.; SOUZA, b.b.; Cambuí, g.b. **Indicadores produtivos, fisiológicos e comportamentais de vacas de leite.** *Revista ACSA - Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 9, n. 4, p. 28-36, out./dez. 2013.

NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P. **Tamanho da amostra para estudo da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo bovino.** *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.81-85, 2002.

O'DOHERTY, A. M.; O'SHEA, L. C.; FAIR, T. **Bovine DNA Methylation Imprints Are Established in an Oocyte Size-Specific Manner**, Which Are Coordinated with the Expression of the DNMT3 Family Proteins. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 3, p. 1–10, 2012

OKUDAIRA, Y.; WAKAI, T.; FUNAHASHI, H. **Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from**

small and middle follicles during the first 24-hour period of in vitro maturation. *Journal of Reproduction and Development*, 2017.

PASCHAL JC, SANDERS JO, KERR JL. **Calving and weaning characteristics of Angus-, Gray Brahman-, Gir-, InduBrazil-, Nellore-, and Red Brahman-sired F1 calves.** *J. Anim. Sci.*, v.69, p.2395-2402, 1991.

PINHEIRO, O.L., Barros, C.M., Figueiredo, R.A., Valle, E.R., Encarnação, 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-2-alpha or norgestomet and estradiol valerate.** *Theriogenology*. 49, 667-81, 1998

PAVLOCK A, Lucans H, Niemann H. **Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles.** *Mol Reprod Devel*, v.31, p.63-67, 1992.

RANDEL, R. D. **LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers.** *J. Anim. Sci.* v. 43, p. 300, 1976.

RAMOS, E.M.; CAVALCANTE, T.V.; NUNES, R.R.M. et al. **Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental.** *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, p.696-702, 2008. Disponível em: Acesso em: nov. 2019

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; SILVA, F. M. **Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S. et al. **Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro.** *Mol. Reprod. Dev.*, v.62, p.320-327, 2002. [[Links](#)]

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R. et al. **High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* But Not in *Bos indicus* Cows.** *Theriogenology*, v.49, p.657-665, 1998.

RODRIGUES, T A, KUBRA M, ALL ABDEL A, TRIBULO, HANSEN P, KOH P,

LOPES F F P. **Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock.** *Csiro Publishing, Reproduction, Fertility and Development*, 2019, 31, 888–897
<https://doi.org/10.1071/RD18450>

RODRIGUES, R.A. **O papel do fator de crescimento semelhante a insulina-I sobre as alterações do citoesqueleto induzidas pelo estresse térmico em oócitos bovinos.** Diadema, Brazil: UNIFESP. Tese, 2013.

RUSHEN J, Haley D, de Passillé AM. **Effect of softer flooring in tie stalls on resting behavior and leg injuries of lactating cows.** *J Dairy Sci* 2007;90:3647–51.

SANTOS, G. M. G. et al. **Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles.** *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 10, p. 451, 2013.

SARTORELLI ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. **Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows.** *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition.** In:____. **Spermatozoa in the Female Tract – Transport, Capacitation and Fertilization.** Washington: Pullman, 2003. Cap. 12, p.266-284.

SHABANKAREH HK, Shamsavari MH, Hajarian H, Moghaddam G. **In vitro developmental competence of bovine oocytes: effect of corpus luteum and follicle size.** *Iran J Reprod Med*. 2015;13(10):615-22. PMID:26644789.

SILVA SANTOS-KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, sturio Melo- Sterza FA, Seneda MM. 2011. **As estimativas da população de folículos pré-antrais nos ovários de *Bos taurus indicus* e *Bos Touro Touro gado*.** *Theriogenology*, 76: 1051-1057. Disponível em:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12255/pdf>>. Acesso em: 01 JAN 2020.

Sugimoto, H., Koto, K., Saeki, K., Taniguchi, T. & Hosoi, Y. 2012. **Growth and development of rabbit oocytes in vitro: effect of fetal bovine serum concentration on culture medium.** Theriogenology, 15, 78, 1040-1047.

TESSMANN, J.V. **Transporte–Maturação de oócitos bovinos em palhetas.** 2004.

TETZNER, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2007. 92f.. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.

TRILLO Y, Quintela LA, Barrio M, Becerra JJ, Pena AI, Vigo M, Herradon PG. **Benchmarking welfare indicators in 73 free-stall dairy farms in northwestern Spain.** Vet Rec Open 2017; 4:e00178. doi:10.1136/vetreco-2016-000178
URREGO, R.; HERRERA-PUERTA, E.; CHAVARRIA, N.A.; CAMARGO, O.; WRENZYCKI, C.;

RODRIGUEZ-OSORIO, N. **Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence.** Theriogenology, v. 83, n. 7, p. 1179-1187, 2015.

USHMAN, R.A. et al. **Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight.** Journal Animal Science, v.87, p.1871-1980, 2009.

Disponível em:

<<http://www.journalofanimalscience.org/content/87/6/1971.full.pdf+html>>. Acesso em:

VIANNA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. et al. **Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.51, n.3, p.251-256, 1999.

VASSENA R, Mapletoft JR, Allodi S, Singh J, Adams PG. **Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status.** Theriogenology, v.60, p.923-932, 2003

Viana, J. H. M. & Bols, P. E. J. 2005. **Variações biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócitos por aspiração folicular.** *Acta Scientiae Veterinariae*, 33, 1-4.

WATSON, A.J.; SOUZA, P.D.; CAVENEY, A. et al. **Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis.** *Biol. Reprod.*, v.62, p.355-364, 2000.

WILTBANK M, LOPEZ H, SARTORI R, SANGSRITAVONG S, GÜMEN A 2006 **Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism.** *Theriogenology* 65 17– 799 29.

WOLFENSON, D.; THACHER, W.W.; BADINGA, L. et al. **A Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle.** *Biology of Reproduction*.v. 52, p. 1106-1113, 1995.

ANEXO I- Meios de Maturação Utilizados no Procedimento de Fertilização *In Vitro*.

APÊNDICE A – Meio de Maturação

Meio de maturação em TCM-199 bicarbonato suplementado com macromoléculas (10% (v/v) de SFB ou 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos dependendo do pré-experimento), 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de estradiol, 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10 µg/mL de hormônio luteinizante (LH).

APÊNDICE B – Meio de FIV

Para a Fertilização In Vitro será utilizados meio FIV composto por TL-Stock 114mM de Cloreto de Sódio, 3mM de Cloreto de Potássio, 0.5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado, 0.3mM de Fosfato de Sódio bibásico andro, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 12mM de DLÁcido Lático (60%), 1.0g/ml de Bissulfito de sSódio, Salina 0.9% e 2mM de D-Pencialamania, 176u/mg de heparina e 6mg/mL de BSA(FIV).

APÊNDICE C- Meio de Percol 90%

Solução de Percoll 90% composto por 31mM de Cloreto de Potássio, 3mM de Dihidrofosfato de sódio monohidratado, 800Mm de Cloreto de Sódio, 50mM de Hespes Ácido, 50mM de Hepers Sódico, 1.0M de Cloreto de cálcio di-hidrato, 100mM de cloreto de Magnésio hexa-hidratado, 26.4mM de DL- Ácido Lático (60%) e 20mM de Bicarbonato de Sódio.

APÊNDICE D- Meio TL-Sêmen

Meio TI-Sêmen composto por 100mM de Cloreto de Sódio, 3mM de Cloreto de Potássio, 0.4mM de Cloreto de Magnésio hexanhidratado, 0.3mM de Fosfato de Sódio bibásico andidro, 25mM de Bicarbonmato de Sódio, 2mM de cloreto de cálcio di-hidratado, 26mM de DL-Ácido Lático (60%) 30m de *Phenol Red*.

APÊNDICE E- Meio SOF

Meio SOF constituído de 1.1M de cloreto de sódio, 72mM de Cloreto de Potássio, 12mM de Fosfato de Potássio Monobássico, 7.4mM de sulfato de Magnésio, 50M de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio, 260M de *Phenol Red*, 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM não essenciais 100x, 2.8mM de Myo-Inostiol, 340M de Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico, 5mg/mL de BSA(CIV) e 2.5% de SFB.

APÊNDICE F- Meio HSOF

Meio HSOF composto por 1.1M de Cloreto de Sódio, 72mM de Cloreto de Potássio, 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico, 7.4mM de Sulfato de Magnésio, 50M de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio, 260M de *Phenol Red*, 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 125mM de Hepes Sódico, 125mM de Hepes Ácido, 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-essenciais 100x, 2,8mM de MyoInositol, 340M de Trípitrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico, 83.4g/ml de Sulfato Amicacina, 5mg/ml de BSA(CIV) e 2,5% de SFB.

APÊNDICE G- Gotas de Maturação

Gotas da maturação composta por complexo cúmulus oócitos de cada doadora identificada ao fundo da placa sendo 25 oócitos por gota meio MIV composto por TCM-199 bicarbonato suplementado com macromoléculas (10% (v/v) de SFB ou 6 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos (dependendo do experimento). 50 µg/ml de gentamicina, 0,2 mm de piruvato de sódio, 1 µg/ml de estradiol, 10 µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10 µg/ml de hormônio luteinizante (LH).

1.2 Placa com 7 gota de FIV composta por sêmen e complexo cúmulus oócitos de cada doadora identificada ao fundo da placa sendo 25 oócitos por gota meio FIV composto por TL-Stock[114mM de Cloreto de Sódio, 3mM de Cloreto de Potássio, 0.5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado, 0.3mM de Fosfato de Sódio bi básico ando, 25 mm de Bicarbonato de Sódio, 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 12mM de DL Ácido Lático (60%), 1.0g/ml de Bissulfeto de Sódio, Salina 0.9% e 2mM de D-Penicilina, 176u/mg de heparina e 6mg/ml de BSA(FIV).

1.3 Placa com 7 gota de SOF composta por zigotos de cada doadora identificada ao fundo da placa sendo 15 zigoto por gota meio SOF composto por 1.1M de cloreto de sódio, 72mM de Cloreto de Potássio, 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico, 7.4mM de sulfato de Magnésio, 50M de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio, 260M de *Phenol Red.*, 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM não essenciais 100x, 2.8mM de Myo-Inostiol, 340M de Tri- nitrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico, 5mg/ml de BSA(CIV) e 2.5% de SFB.

1.4 Terceiro dia (D3) Avaliação da clivagem e troca do meio retira 30µL repõe 30µL

1.5 Quinto dia (D5) Avaliação da clivagem e troca do meio retira 30µL repõe 30µL.

1.6 Embriões em D7 aptos para envase em meio HSOF composto por 1.1M de Cloreto de Sódio, 72Mm de Cloreto de Potássio, 12mM de

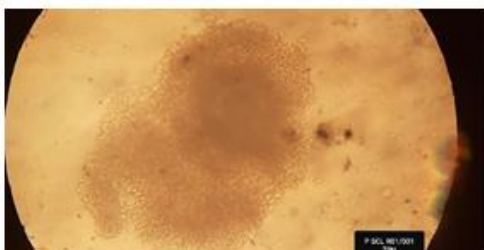
Fosfato de Potássio Monobásico, 7.4mM de Sulfato de Magnésio, 50M de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio, 260M de *Phenol Red.*, 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado, 125mM de Herpes Sódico, 125mM de Herpes Ácido, 200mM d L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-essenciais 100x, 2,8mM de Myo-Inositol, 340M de Tri-nitrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico, 83.4g/ml de Sulfato Amicíssima, 5mg/ml de BSA(CIV) e 2,5% de SFB. 1.7 Inovulação do embrião em receptora com ovulação.

ANEXO II – PORTIFÓLIO MATURAÇÃO EXPERIMENTO I

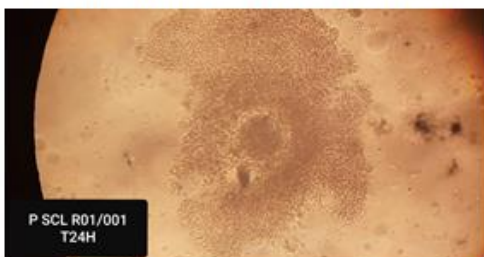
PORTIFÓLIO MATURAÇÃO EXPERIMENTO 1

COLETA: 01/04/2020

FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H



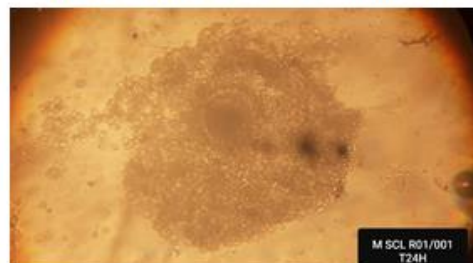
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H



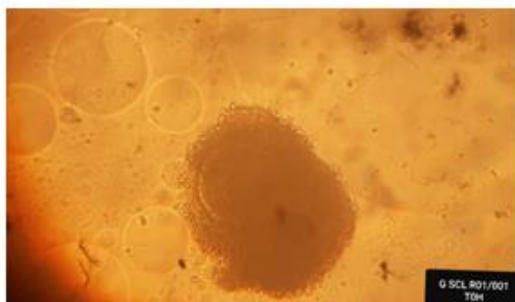
FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H



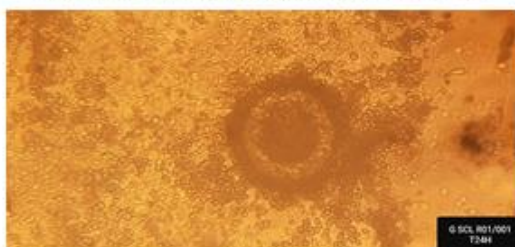
FOLICULO TAMANHO m SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H

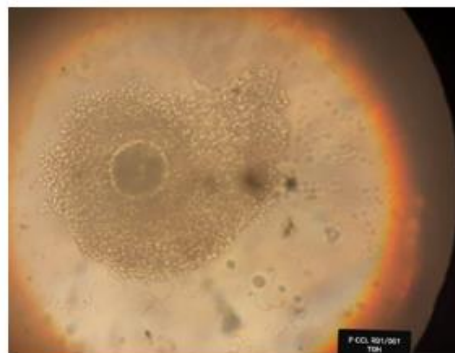


FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H

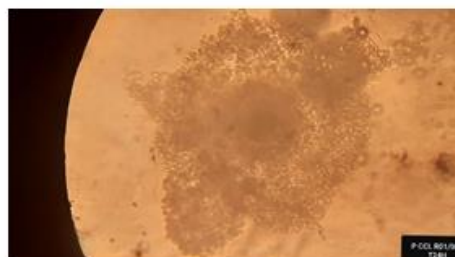


COLETA: 01/04/2020

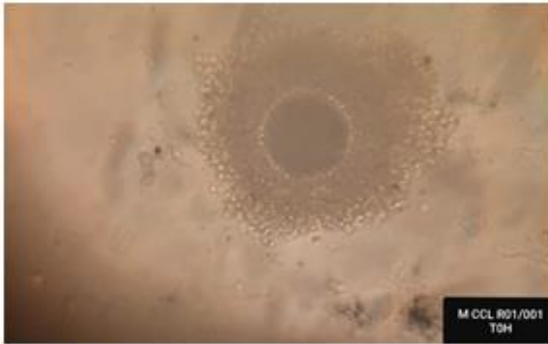
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H



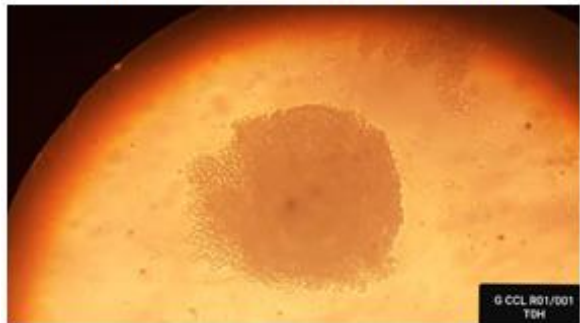
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H



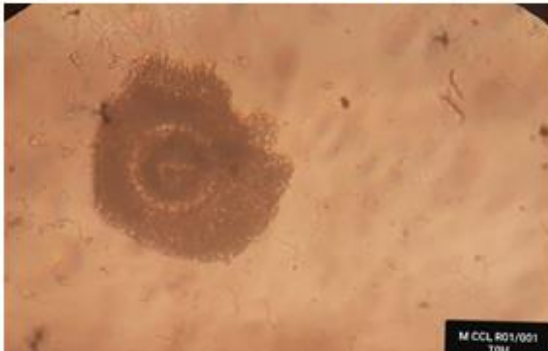
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H



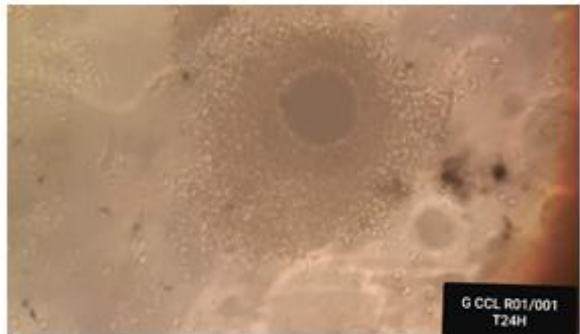
FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA01/001- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA01/001- TEMPO 24H

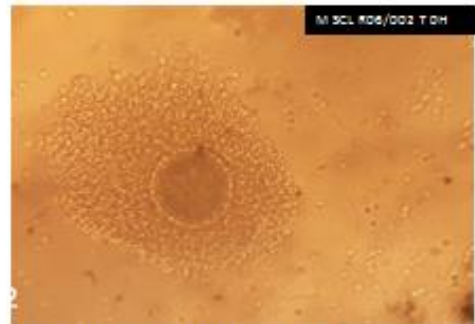


COLETA: 06/04/2020

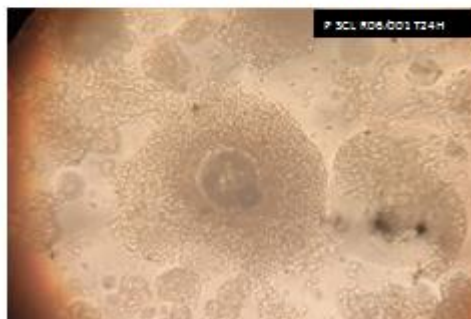
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



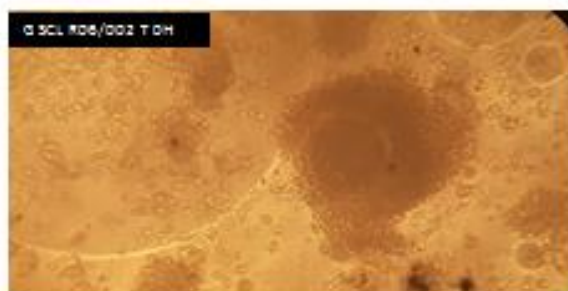
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H



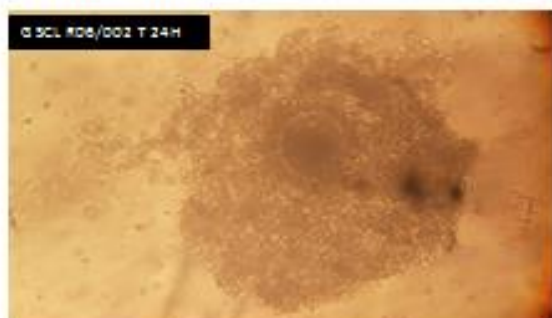
FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H

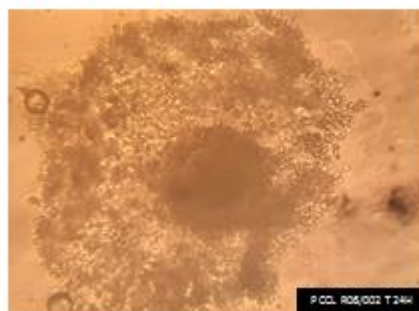


COLETA: 06/04/2020

FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H

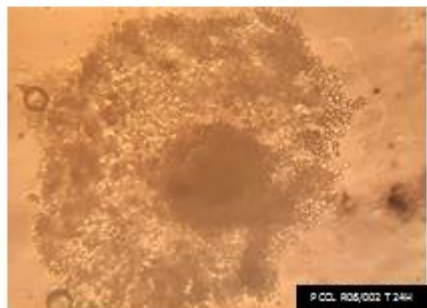


COLETA: 06/04/2020

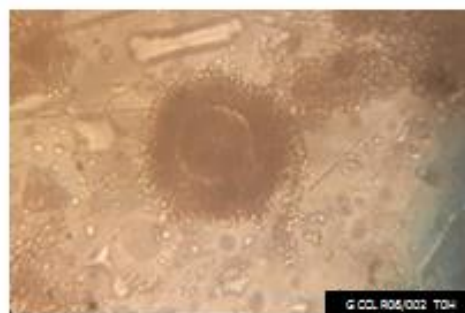
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



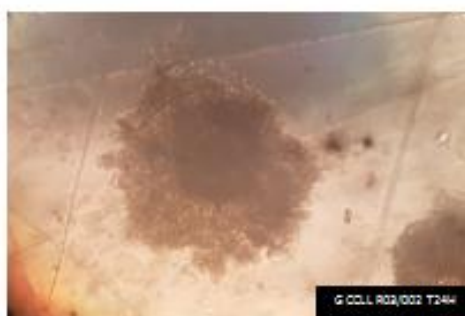
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA06/002- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA06/002- TEMPO 24H

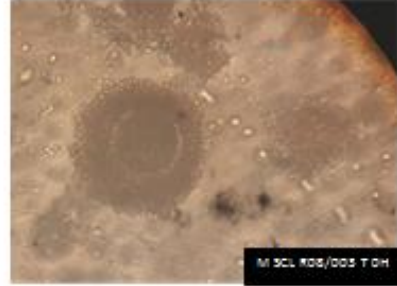


COLETA: 08/04/2020

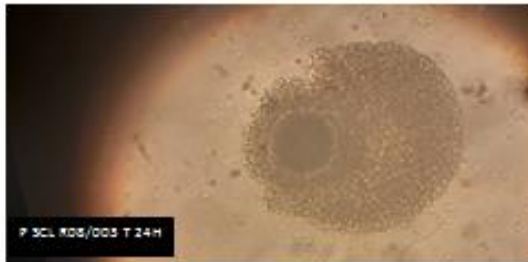
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



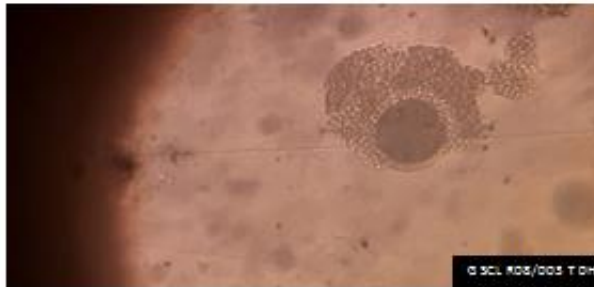
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



COLETA: 08/04/2020

FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



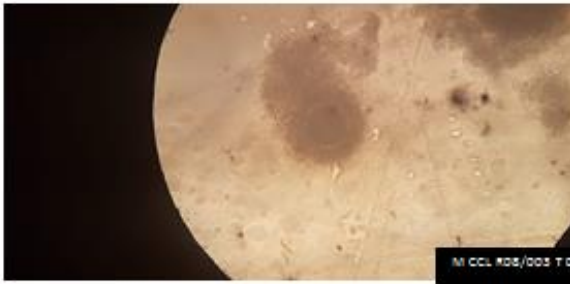
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H



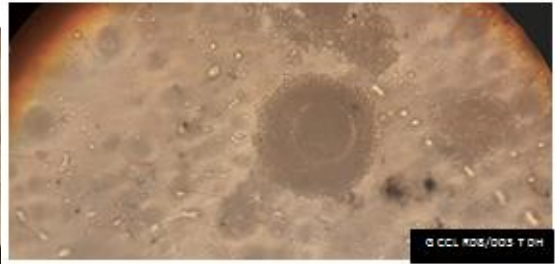
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H



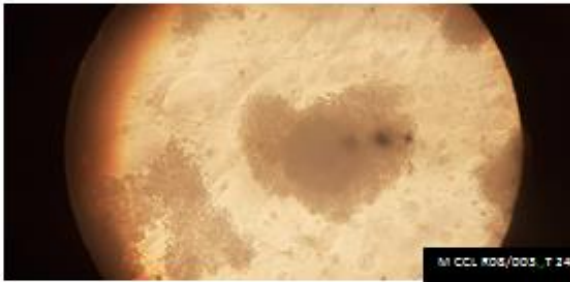
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



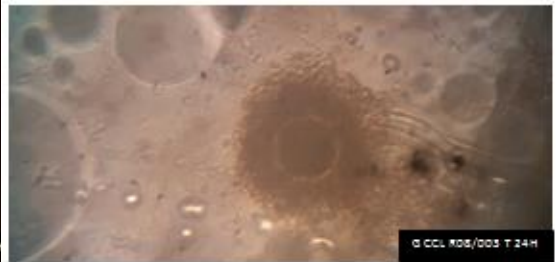
FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA08/003- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H

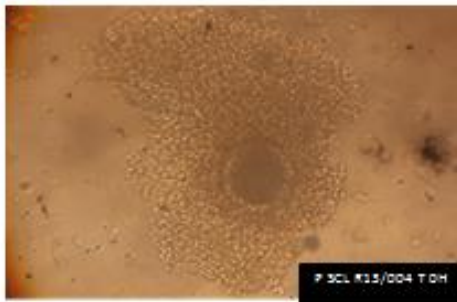


FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA08/003- TEMPO 24H



COLETA:13/04/2020

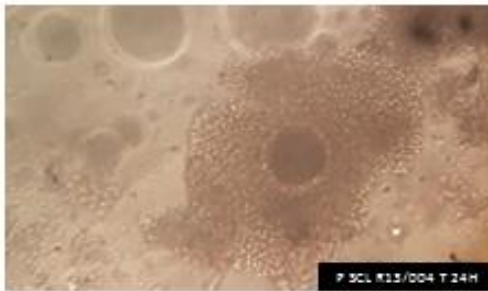
FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H



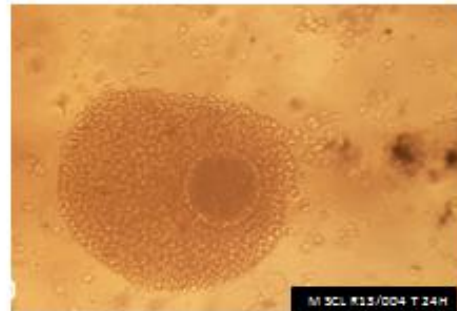
FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H

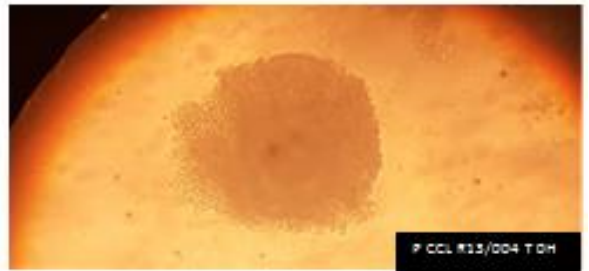


FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H

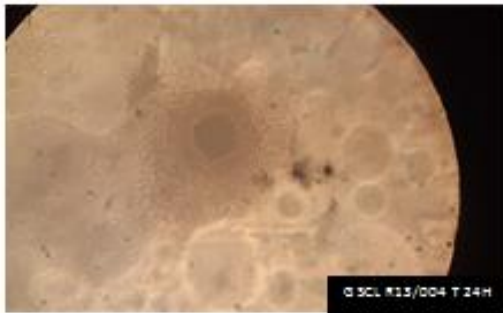


COLETA: 13/04/2020

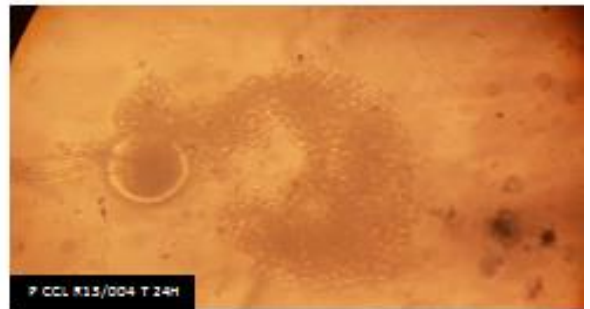
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H



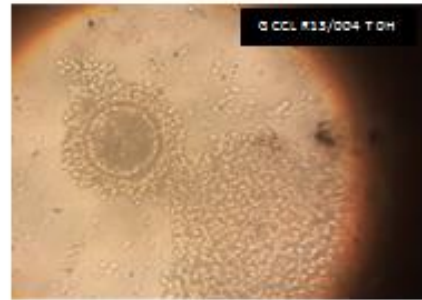
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H



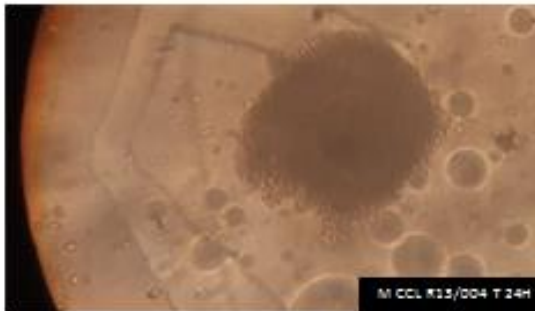
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H



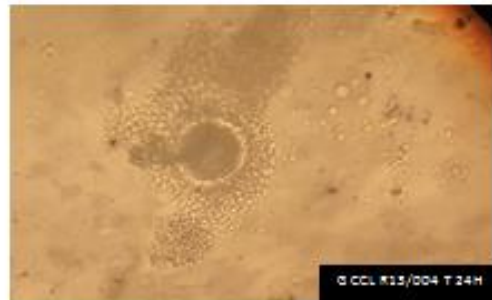
FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA13/004- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA13/004- TEMPO 24H

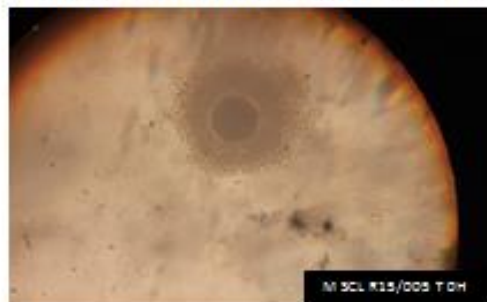


COLETA: 15/04/2020

FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 24H

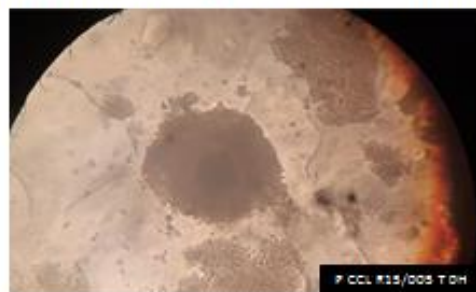


FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 0H



COLETA: 15/04/2020

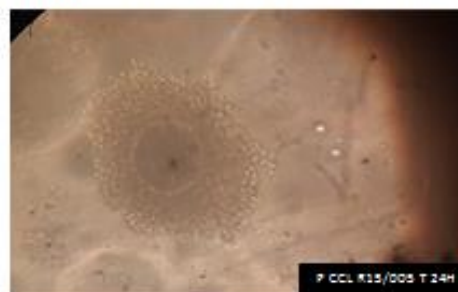
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 15/005- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 15/005- TEMPO 24H



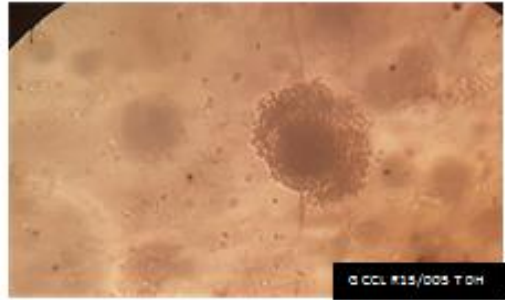
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 15/005- TEMPO 24H



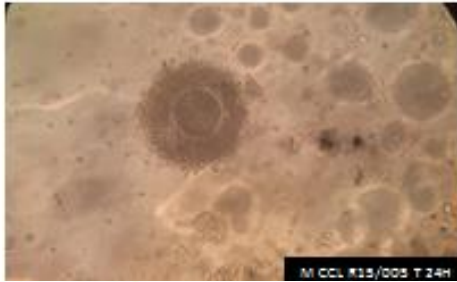
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA15/005- TEMPO 0H



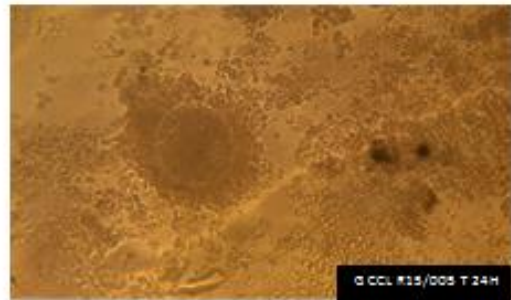
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA15/005- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 15/005-TEMPO 24H

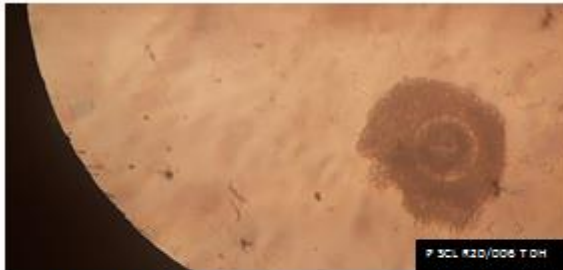


FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 15/005-TEMPO 24H

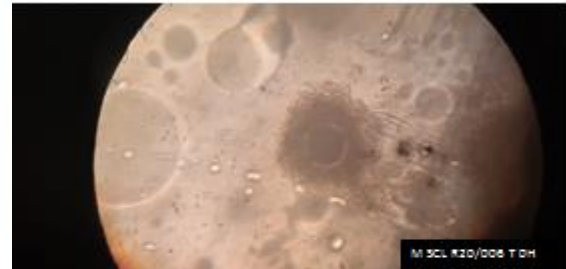


COLETA: 20/04/2020

FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 20/006-TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 20/006- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 20/006-TEMPO 24H

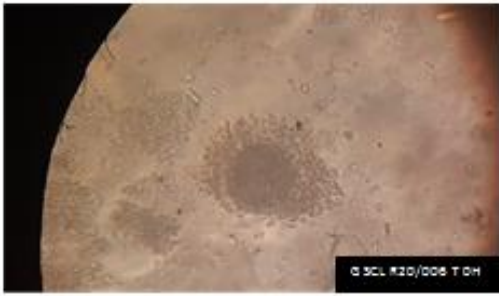


FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 20/006- TEMPO 24H

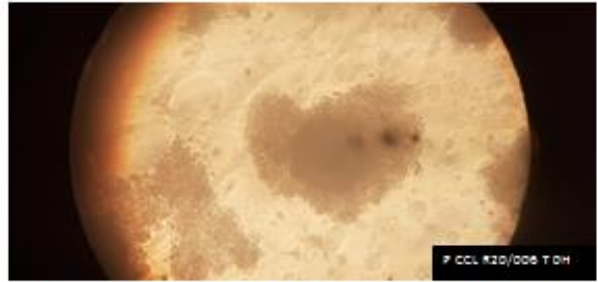


COLETA: 20/04/2020

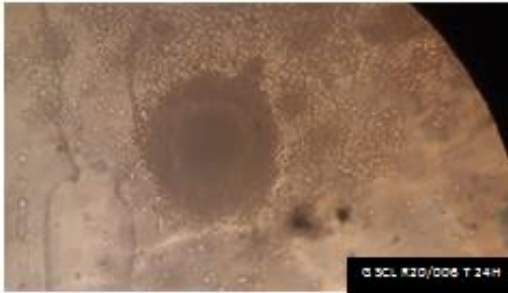
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 20/006-TEMPO 0H



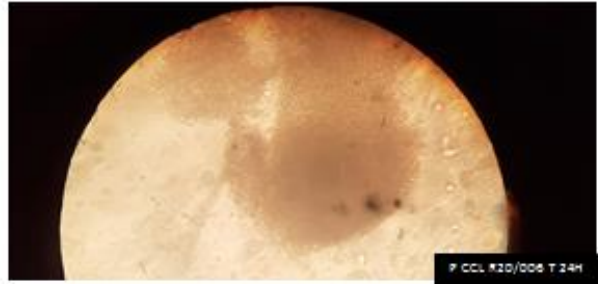
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 20/006-TEMPO 24H



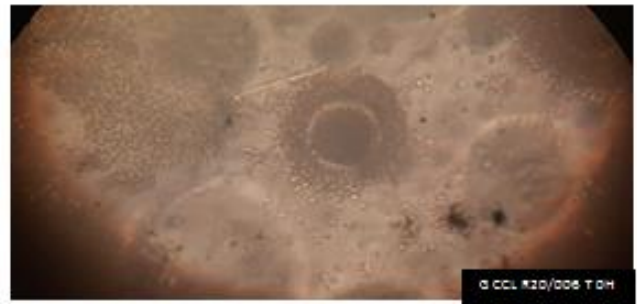
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 24H



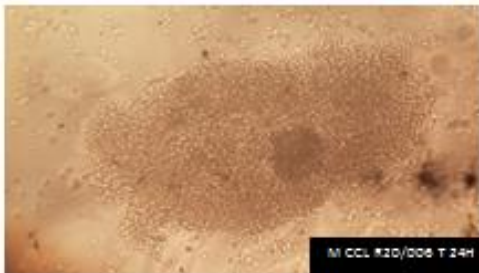
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 0H



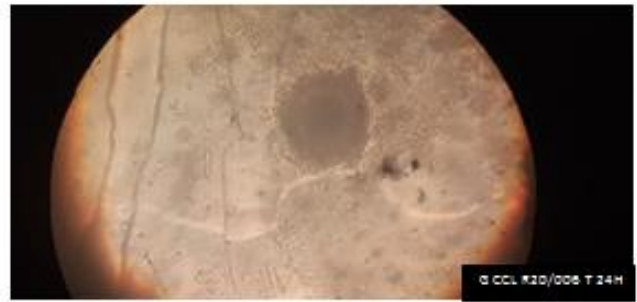
FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 24H

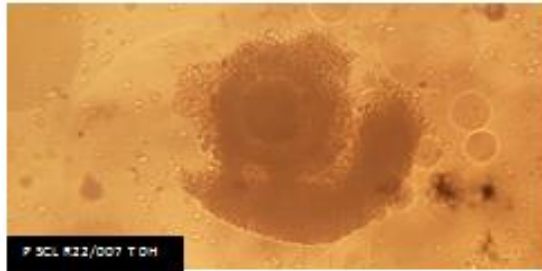


FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 20/006-TEMPO 24H

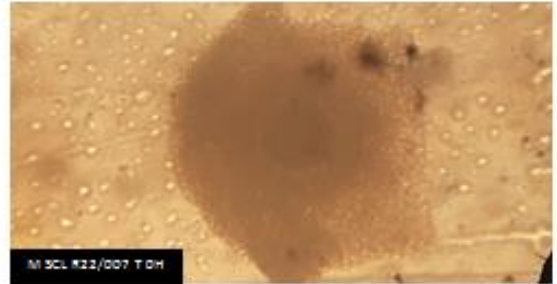


COLETA: 22/04/2020

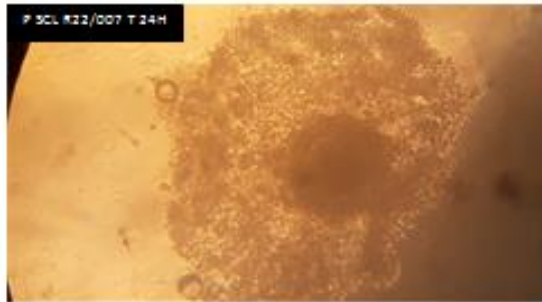
FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 22/007- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 22/007- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 22/007-TEMPO 24H

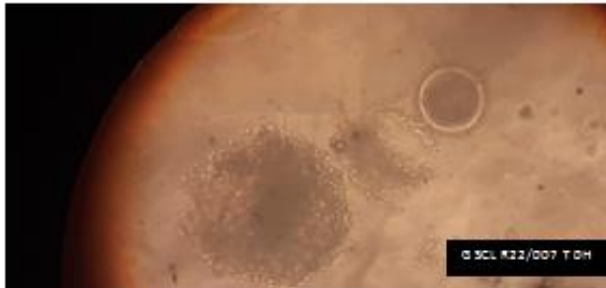


FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 22/007- TEMPO 24H

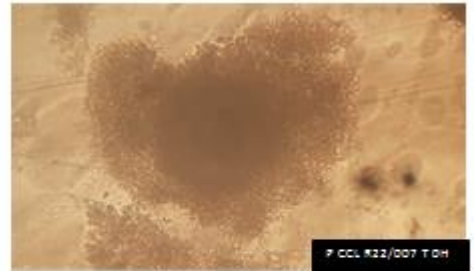


COLETA: 22/04/2020

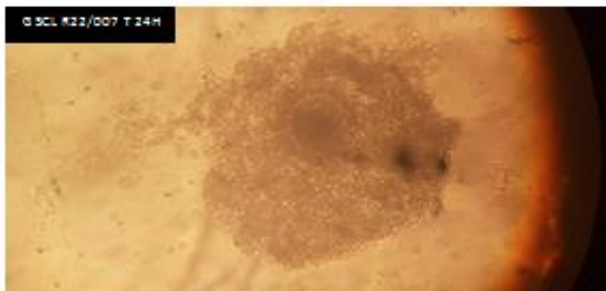
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 22/007-TEMPO 0H



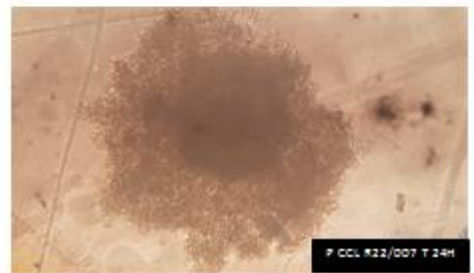
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 0H



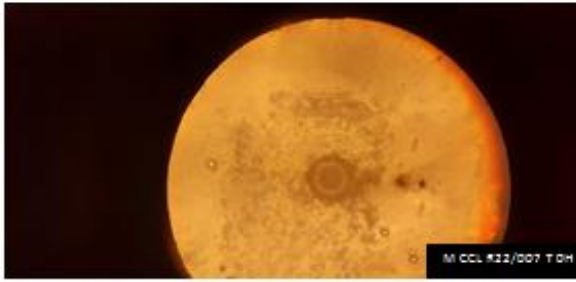
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 22/007-TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 24H



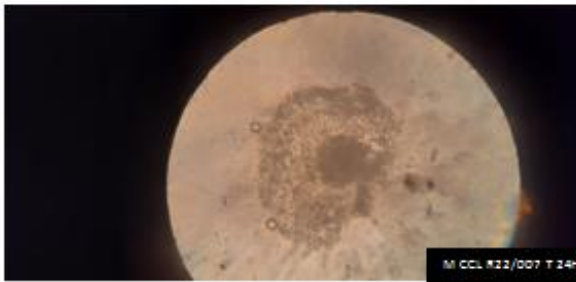
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 0H



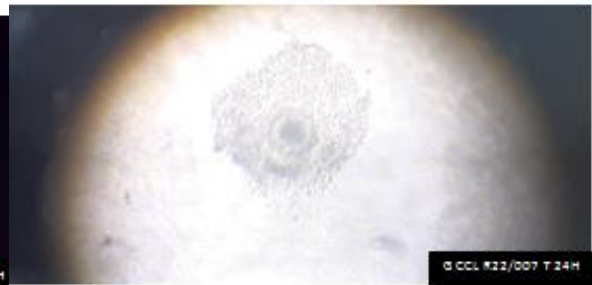
FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 24H

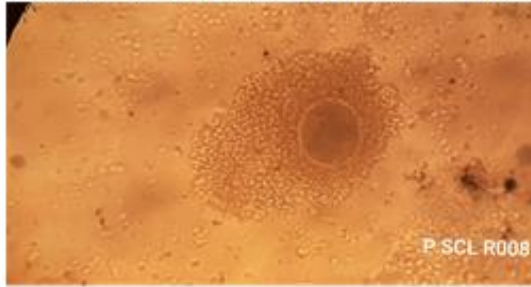


FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 22/007-TEMPO 24H

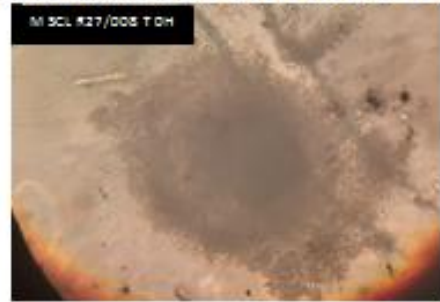


COLETA: 27/04/2020

FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 27/008- TEMPO 0H



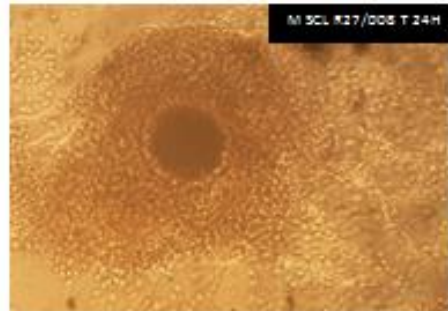
FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 27/008- TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO P SEM CL REPLICA 27/008- TEMPO 24H

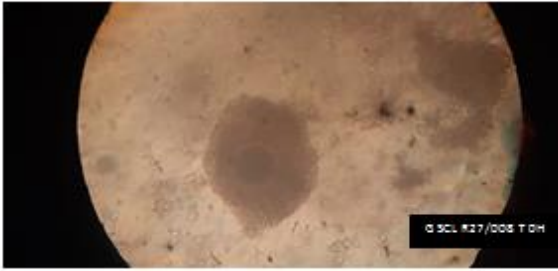


FOLICULO TAMANHO M SEM CL REPLICA 27/008- TEMPO 24H

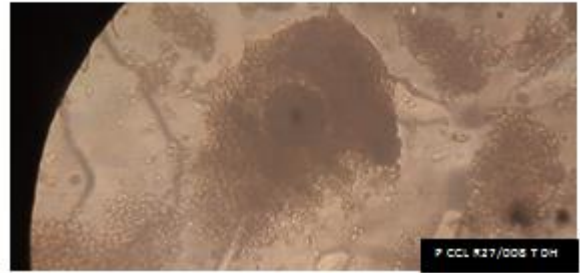


COLETA: 27/04/2020

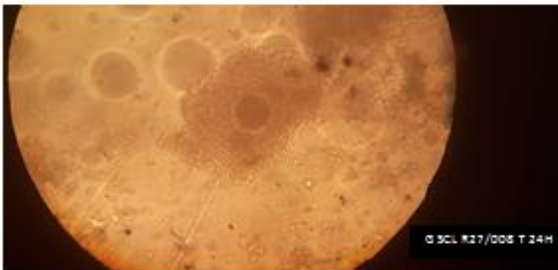
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 27/008-TEMPO 0H



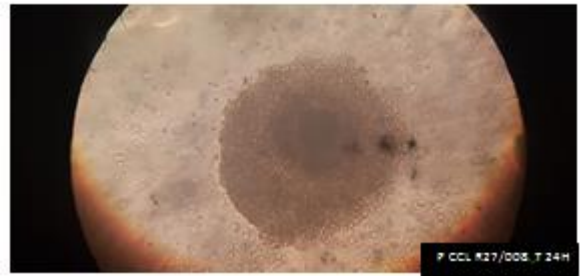
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 0H



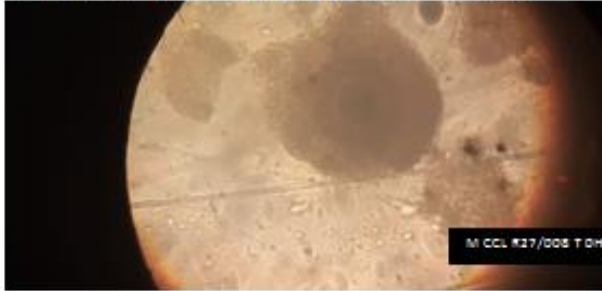
FOLICULO TAMANHO G SEM CL REPLICA 27/008-TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 24H



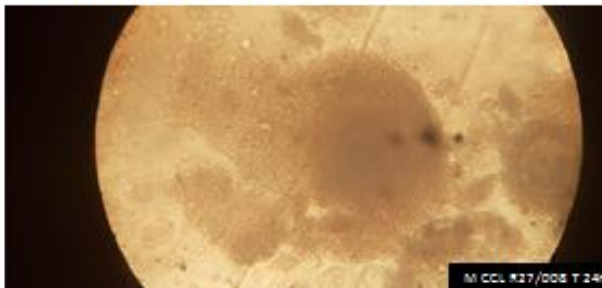
FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 0H



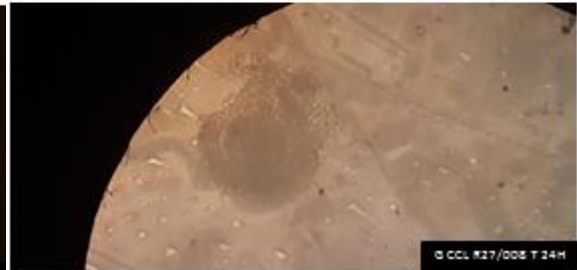
FOLICULO TAMANHO P COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 0H



FOLICULO TAMANHO M COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 24H



FOLICULO TAMANHO G COM CL REPLICA 27/008-TEMPO 24H



ANEXO III- TABELA DE EXPANSÃO DAS CÉÇULAS DO CUMULUS EXPERIMENTO I

Tabela 8 - Expansão das células do cumulus em oócitos obtidos de vacas Nelore e Greyman pós maturação in vitro.

| TABELA-MEDIDAS CÉÇULAS CUMULUS OÓCITOS | | | | | | |
|--|-------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| REPICA 1 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
| P SEM CL | 0 H | 116,66 | 100,04 | 9166,19 | | |
| P SEM CL | 24 H | 116,25908 | 120,31146 | 10985,63 | 1819,43 | 16,56 |
| M SEM CL | 0H | 100,63358 | 108,79306 | 8598,743853 | | |
| M SEM CL | 24H | 126,0456 | 114,7913 | 11363,90413 | 2765,16 | 24,33 |
| G SEM CL | 0 H | 713,0107 | 742,9103 | 416028,7307 | | |
| G SEM CL | 24H | 689,8948 | 769,9956 | 417217,0153 | 1188,28 | 0,28 |
| P COM CL | 0 H | 874,0214 | 730,3714 | 501368,1274 | | |
| P COM CL | 24 H | 111,5345 | 114,783 | 10054,89855 | -491313,23 | -97,99 |
| M COM CL | 0H | 927,1947 | 900,1647 | 655516,7833 | | |
| M COM CL | 24H | 723,0632 | 733,8017 | 416721,4632 | -238795,32 | -36,43 |
| G COMCL | 0 H | 741,5721 | 894,124 | 520765,2917 | | |
| G COMCL | 24H | 106,6718 | 964,6676 | 80819,88213 | -439945,41 | -84,48 |
| REPICA 2 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
| P SEM CL | 0 H | 799,0815 | 811,6284 | 509376,8558 | | |
| P SEM CL | 24 H | 660,0971 | 679,6963 | 352381,9281 | -156994,93 | -30,82 |
| M SEM CL | 0H | 951,237 | 822,6058 | 614570,0598 | | |
| M SEM CL | 24H | 111,3397 | 983,8212 | 86031,42579 | -528538,63 | -86,00 |
| G SEM CL | 0 H | 799,5756 | 714,9642 | 448987,9916 | | |
| G SEM CL | 24H | 106,671 | 964,6675 | 80819,26763 | -368168,72 | -82,00 |
| P COM CL | 0 H | 108,8407 | 125,7807 | 10752,17268 | | |
| P COM CL | 24 H | 114,7849 | 139,0663 | 12537,11349 | 1784,94 | 14,24 |
| M COM CL | 0H | 116,2255 | 123,2029 | 11246,39287 | | |
| M COM CL | 24H | 113,8677 | 122,9772 | 10998,05902 | -248,333849 | -2,21 |
| G COMCL | 0 H | 652,8483 | 684,5093 | 350980,1276 | | |
| G COMCL | 24H | 917,5576 | 912,6861 | 657726,9998 | 306746,87 | 46,64 |
| REPICA 3 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
| P SEM CL | 0 H | 110,9122 | 121,3329 | 10569,36253 | | |
| P SEM CL | 24 H | 839,1658 | 108,3237 | 71394,07295 | 60824,71 | 85,20 |
| M SEM CL | 0H | 651,6991 | 623,5276 | 319149,1559 | | |
| M SEM CL | 24H | 103,4257 | 111,0658 | 9021,93544 | -310127,22 | -97,17 |
| G SEM CL | 0 H | 799,5756 | 714,9642 | 448987,9916 | | |
| G SEM CL | 24H | 111,5345 | 114,783 | 10054,89855 | -438933,09 | -97,76 |
| P COM CL | 0 H | 738,0882 | 862,0458 | 499723,1851 | | |
| P COM CL | 24 H | 827,1591 | 878,0328 | 570414,6733 | 70691,49 | 12,39 |
| M COM CL | 0H | 614,1356 | 689,2609 | 332459,5501 | | |
| M COM CL | 24H | 807,5811 | 659,209 | 418119,2584 | 85659,71 | 20,49 |
| G COMCL | 0 H | 517,8566 | 574,0581 | 233483,536 | | |
| G COMCL | 24H | 917,5576 | 912,6886 | 657728,8014 | 424245,27 | 64,50 |
| REPICA 4 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
| P SEM CL | 0 H | 739,2944 | 845,4044 | 490877,1509 | | |
| P SEM CL | 24 H | 839,1658 | 109,3202 | 72050,84698 | -418826,30 | -85,32 |
| M SEM CL | 0H | 111,0658 | 103,42557 | 9021,9241 | | |
| M SEM CL | 24H | 651,6991 | 623,5276 | 319149,1559 | 310127,23 | 97,17 |
| G SEM CL | 0 H | 584,0427 | 738,0923 | 338568,2055 | | |
| G SEM CL | 24H | 644,1868 | 616,0153 | 311669,4376 | -26898,77 | -8,63 |
| P COM CL | 0 H | 847,0294 | 756,8729 | 503514,9122 | | |
| P COM CL | 24 H | 829,9964 | 828,6797 | 540199,0372 | 36684,12 | 6,79 |
| M COM CL | 0H | 132,7675 | 100,7762 | 10508,49817 | | |
| M COM CL | 24H | 839,6776 | 844,706 | 557069,0671 | 546560,57 | 98,11 |
| G COMCL | 0 H | 511,0573 | 645,7169 | 259180,6927 | | |
| G COMCL | 24H | 662,263 | 858,6969 | 446643,7736 | 187463,08 | 41,97 |

| REPICA 5 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
|----------|-------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| P SEM CL | 0H | 738,0882 | 802,0458 | 464941,5168 | | |
| P SEM CL | 24H | 905,7978 | 103,7778 | 73828,93748 | -391112,58 | -84,12 |
| M SEM CL | 0H | 927,8547 | 764,5731 | 557172,7694 | | |
| M SEM CL | 24H | 885,4986 | 733,0767 | 509833,2927 | -47339,48 | -8,50 |
| G SEM CL | 0H | 688,322 | 625,4006 | 338096,6294 | | |
| G SEM CL | 24H | 662,263 | 858,6969 | 446643,7736 | 108547,14 | 24,30 |
| P COM CL | 0H | 635,9379 | 578,5602 | 288970,9329 | | |
| P COM CL | 24H | 781,5054 | 854,257 | 524338,1125 | 235367,18 | 44,89 |
| M COM CL | 0H | 614,1356 | 689,2609 | 332459,5501 | | |
| M COM CL | 24H | 621,8586 | 611,0998 | 298465,8749 | -33993,68 | -11,39 |
| G COM CL | 0H | 487,5572 | 358,6678 | 137343,737 | | |
| G COM CL | 24H | 676,8731 | 610,4619 | 324531,3945 | 187187,66 | 57,68 |
| | | | | | | |
| REPICA 6 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
| P SEM CL | 0H | 745,2183 | 770,1567 | 450768,4443 | | |
| P SEM CL | 24H | 100,0936 | 850,6178 | 66870,05385 | -383898,39 | -85,17 |
| M SEM CL | 0H | 651,6991 | 623,5271 | 319148,9 | | |
| M SEM CL | 24H | 951,2374 | 822,0658 | 614166,8833 | 295017,98 | 48,04 |
| G SEM CL | 0H | 463,8994 | 472,579 | 172182,5466 | | |
| G SEM CL | 24H | 676,8731 | 6110,1062 | 3248231,029 | 3076048,48 | 94,70 |
| P COM CL | 0H | 843,6789 | 768,4482 | 509193,3021 | | |
| P COM CL | 24H | 930,5647 | 825,9044 | 603625,045 | 94431,74286 | 15,64 |
| M COM CL | 0H | 597,1076 | 575,0976 | 269702,549 | | |
| M COM CL | 24H | 153,4129 | 847,1249 | 102070,4957 | -167632,05 | -62,15 |
| G COM CL | 0H | 463,8994 | 472,579 | 172182,5466 | | |
| G COM CL | 24H | 611,0998 | 621,8586 | 298465,8749 | 126283,33 | 42,31 |

| REPICA 7 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
|----------|-------|-------------|----------|-------------|------------|------------|
| P SEM CL | 0H | 743,6411 | 616,2741 | 359938,4132 | | |
| P SEM CL | 24H | 133,4626 | 118,3641 | 12407,10559 | -347531,31 | -96,55 |
| M SEM CL | 0H | 739,2944 | 845,4044 | 490877,1509 | | |
| M SEM CL | 24H | 128,1793 | 958,4054 | 96484,60972 | -394392,54 | -80,34 |
| G SEM CL | 0H | 750,8583 | 722,0583 | 425815,1875 | | |
| G SEM CL | 24H | 116,2625 | 113,0171 | 10319,88157 | -415495,31 | -97,58 |
| P COM CL | 0H | 124,1433 | 103,8141 | 10122,09772 | | |
| P COM CL | 24H | 917,5576 | 912,6861 | 657726,9998 | 647604,90 | 98,46 |
| M COM CL | 0H | 139,0663 | 114,8496 | 12544,18019 | | |
| M COM CL | 24H | 781,1644 | 842,6952 | 517015,8533 | 504471,67 | 97,57 |
| G COM CL | 0H | 609,9639 | 522,1105 | 250125,2045 | | |
| G COM CL | 24H | 751,9164 | 897,6347 | 530102,7864 | 279977,58 | 52,82 |

| REPICA 8 | TEMPO | COMPRIMENTO | LARGURA | 0,7854 | EXPANSÃO | % EXPANSÃO |
|----------|-------|-------------|----------|-------------|------------|------------|
| P SEM CL | 0H | 109,056 | 846,2836 | 72486,37578 | | |
| P SEM CL | 24H | 861,7216 | 768,9208 | 520402,633 | 447916,26 | 86,07 |
| M SEM CL | 0H | 192,01 | 915,7239 | 138095,4259 | | |
| M SEM CL | 24H | 320,8545 | 125,8546 | 31715,24899 | -106380,18 | -77,03 |
| G SEM CL | 0H | 631,0037 | 721,5791 | 357607,607 | | |
| G SEM CL | 24H | 680,3154 | 672,5404 | 359351,595 | 1743,99 | 0,49 |
| P COM CL | 0H | 105,7844 | 999,7208 | 83059,87097 | | |
| P COM CL | 24H | 960,9946 | 101,256 | 76424,50092 | -6635,37 | -7,99 |
| M COM CL | 0H | 808,4041 | 803,9588 | 510449,9877 | | |
| M COM CL | 24H | 106,6137 | 936,3698 | 78406,36336 | -432043,62 | -84,64 |
| G COM CL | 0H | 701,9577 | 663,8666 | 366001,3257 | | |
| G COM CL | 24H | 669,3906 | 746,0076 | 392205,571 | 26204,25 | 6,68 |

Valores de % de expansão negativas foram calculado: $\text{expansão} \cdot 100 / \text{pelo valor inicial tempo 24 horas}$.

Valores de % de expansão positivas foram calculado: $\text{expansão} \cdot 100 / \text{pelo valor inicial tempo 24 horas}$.

ANEXO IV- TABELA EXPERIMENTO II

Tabela 9. Classificação morfológica de CCOs obtidos na OPU de vacas Nelore e Greyman, destinados à PIVE.

| DOADORAS | GRAU I N (%) | GRAU II N (%) | GRAU III N (%) | DESNUDO N (%) | OÓCITOS VIÁVEIS N (%) |
|------------------------|--------------|---------------|----------------|---------------|-----------------------|
| Réplica 1 Maio | | | | | |
| Nelore | 86 | 42 | 38 | 37 | 166 |
| % | 51,81 | 25,30 | 22,89 | | |
| Greyman | 36 | 33 | 30 | 21 | 99 |
| % | 36,36 | 33,33 | 30,30 | | |
| Réplica 2 Junho | | | | | |
| Nelore | 63 | 85 | 20 | 33 | 168 |
| % | 37,5 | 50,60 | 11,90 | | |
| Greyman | 25 | 50 | 11 | 25 | 86 |
| % | 29,07 | 58,14 | 12,79 | | |
| Réplica 3 Julho | | | | | |
| Nelore | 71 | 80 | 20 | 33 | 171 |
| % | 41,52 | 46,78 | 11,70 | | |
| Greyman | 28 | 33 | 21 | 19 | 82 |
| % | 34,15 | 40,24 | 25,61 | | |

Anexo V- Réplicas Experimento II

Tabela 10 - Número de CCOs viáveis obtidos na OPU em vacas doadoras da raça Nelore.

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|-----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| RDM 8512 | REM ARMADOR | 12 | 4 |
| JLB 2591 | REM ARMADOR | 37 | 8 |
| JLB 2389 | REM ARMADOR | 42 | 9 |
| JLB 642 | REM ARMADOR | 23 | 6 |
| RDM 6542 | REM ARMADOR | 52 | 10 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 166 | 37 |

Réplica1 - realizada em maio de 2020

Tabela 11 - Índices da PIVE obtidos em vacas Nelore PO.

| <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES DGI</i> | <i>DGF</i> |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------|
| 60% | 9 | 9 | 3 | 3 |
| 22% | 7 | 6 | 4 | 4 |
| 15% | 11 | 10 | 8 | 8 |
| 34% | 11 | 8 | 5 | 5 |
| 10% | 11 | 11 | 4 | 4 |
| | 49 | 44 | 24 | 24 |

Réplica 1- realizada em maio de 2020

Tabela 12 - Número de CCOs viáveis obtidos na OPU em vacas doadoras da raça Greyman.

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| 9 | REM ARMADOR | 21 | 5 |
| 10 | REM ARMADOR | 36 | 4 |
| 17 | REM ARMADOR | 12 | 5 |
| 22 | REM ARMADOR | 23 | 5 |
| 12 | REM ARMADOR | 7 | 2 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 99 | 21 |

Réplica 1- realizada em maio de 2020

Tabela 13 - Índices da PIVE obtidos em vacas Greyman

| <i>DOADORA</i> | <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES</i> | <i>DGF</i> |
|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| 9 | 47% | 11 | 10 | 3 | 3 |
| 10 | 57% | 18 | 14 | 10 | 10 |
| 17 | 53% | 7 | 6 | 4 | 4 |
| 22 | 24% | 8 | 6 | 2 | 2 |
| 12 | 100% | 7 | 7 | 5 | 5 |
| | | 51 | 43 | 24 | 24 |

Réplica 1- realizada em maio de 2020

Tabela 14 - Número de CCOs viáveis obtido OPU em vacas doadoras da raça Nelore

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|-----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| RDM 8512 | REM ARMADOR | 35 | 10 |
| JLB 2591 | REM ARMADOR | 28 | 6 |
| JLB 2389 | REM ARMADOR | 39 | 6 |
| JLB 642 | REM ARMADOR | 20 | 2 |
| RDM 6542 | REM ARMADOR | 46 | 9 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 168 | 33 |

Réplica 2- realizada em Junho de 2020

Tabela 15 - Índices da PIVE obtidos em vacas da raça Nelore.

| <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES</i> | <i>DGF</i> |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| 42% | 14 | 14 | 12 | 12 |
| 67% | 13 | 10 | 4 | 4 |
| 75% | 20 | 20 | 14 | 14 |
| 5% | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 30% | 10 | 5 | 3 | 3 |
| | 41 | 51 | 34 | 34 |

Réplica 2- realizada em junho de 2020

Tabela 16 - Número de CCOs viáveis obtidos na OPU em vacas doadoras da raça Greyman

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| 9 | REM ARMADOR | 12 | 3 |
| 10 | REM ARMADOR | 35 | 8 |
| 17 | REM ARMADOR | 15 | 5 |
| 22 | REM ARMADOR | 17 | 4 |
| 12 | REM ARMADOR | 7 | 5 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 86 | 25 |

Réplica 2- realizada em junho de 2020

Tabela 17 - Índices da PIVE obtidos em vacas da raça Greyman

| <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES</i> | <i>DGF</i> |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| 50% | 8 | 8 | 5 | 5 |
| 10% | 9 | 9 | 4 | 4 |
| 44% | 6 | 6 | 2 | 2 |
| 11% | 5 | 5 | 1 | 1 |
| 100% | 7 | 7 | 2 | 2 |
| | 35 | 35 | 14 | 14 |

Réplica 2- realizada em junho de 2020

Tabela 18 - Número de CCOs viáveis obtidos na OPU em vacas doadoras da raça Nelore.

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|-----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| RDM 8512 | REM ARMADOR | 33 | 6 |
| JLB 2591 | REM ARMADOR | 47 | 8 |
| JLB 2389 | REM ARMADOR | 25 | 6 |
| JLB 642 | REM ARMADOR | 25 | 6 |
| RDM 6542 | REM ARMADOR | 41 | 7 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 171 | 33 |

Réplica 3- realizada em julho de 2020

Tabela 19 - Índices da PIVE obtidos em vacas da raça Nelore

| <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES</i> | <i>DGF</i> |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| 27% | 13 | 11 | 10 | 10 |
| 81% | 30 | 30 | 18 | 18 |
| 100% | 25 | 25 | 13 | 13 |
| 92% | 14 | 14 | 10 | 10 |

| | | | | |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 90% | 34 | 24 | 15 | 15 |
| | 120 | 108 | 66 | 66 |

Réplica 3- realizada em julho de 2020

Tabela 20 - Número de CCOs viáveis obtido OPU em vacas doadoras da raça Greyman

| <i>DOADORA</i> | <i>TOURO</i> | <i>OOCITOS VIAVEIS</i> | <i>OOCITOS INVIAVEIS</i> |
|----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| 9 | REM ARMADOR | 11 | 3 |
| 10 | REM ARMADOR | 28 | 5 |
| 17 | REM ARMADOR | 16 | 5 |
| 22 | REM ARMADOR | 21 | 3 |
| 12 | REM ARMADOR | 6 | 3 |
| TOTAL | CONVENCIONAL | 82 | 19 |

Réplica 3- realizada em julho de 2020

Tabela 21 - Índices da PIVE obtidos em vacas da raça Nelore

| <i>CLIVAGEM</i> | <i>BLASTOCITOS</i> | <i>TRANSFERIDO</i> | <i>PRENHEZES</i> | <i>DGF</i> |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| 28% | 4 | 4 | 1 | 1 |
| 95% | 12 | 12 | 4 | 4 |
| 40% | 1 | 1 | ** | ** |
| 50% | 15 | 14 | 8 | 8 |
| 98% | 4 | 4 | 2 | 2 |
| TOTAL | 36 | 35 | 15 | 15 |

Réplica 3- realizada em julho de 2020