

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS É UFT**  
**CAMPUS DE ARAGUAÍNA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**TROPICAL**

**INFLUÊNCIA DO DIA DO ESTRO EM RELAÇÃO A FIV E DA**  
**MORFOLOGIA DO CORPO LÚTEO NO DIA DA INOVULAÇÃO COM**  
**OS ÍNDICES DE PRENHEZ EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES**  
**BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

**Ana Carolina Bernardi Mariani**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Produção Animal

**Araguaína**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

M333i Mariani, Ana Carolina Bernardi

Influência do dia estro em relação à FIV e à morfologia do corpo luteo no dia da involução com os índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Ana Carolina Bernardi Mariani.-- Araguaína: [s. n], 2009.  
56f.; il.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Tânia Vasconcelos Cavalcante

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) ó  
Universidade Federal do Tocantins, 2009.

1. Bovinos 2. Reprodução 3. Fertilização I. Título

CDD 636.291

INFLUÊNCIA DO DIA DO ESTRO EM RELAÇÃO A FIV E DA MORFOLOGIA DO  
CORPO LÚTEO NO DIA DA INOVULAÇÃO COM OS ÍNDICES DE PREENHEZ EM  
RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

ANA CAROLINA BERNARDI MARIANI

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre, tendo sido  
julgado pela Banca Examinadora formada  
pelos professores:

---

Presidente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Vasconcelos Cavalcante  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

---

Membro: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

---

Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francisca Elda Ferreira Dias  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

---

Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Mayumi Maruo  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Araguaína, 19 de fevereiro de 2009.

***Dedico este trabalho às pessoas que mais amo nesta vida: meus pais, Rogério e Maria Elisabeth, e meus amigos tão queridos, que muito contribuíram para o meu sucesso.***

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, à Existência Maior pela força que me conduz.

Aos meus pais Rogério e Maria Elisabeth, por se amarem e, através desse amor, terem me concedido a vida e por me amarem incondicionalmente.

À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup>. Tânia Vasconcelos Cavalcante, por todos os momentos de trabalho e lazer, pelo incentivo à pesquisa, pelos conselhos e por ter se tornado tão essencial à minha vida.

Ao professor Jorge Luís Ferreira, por todo auxílio na orientação do meu projeto e Dissertação.

Aos meus amigos, alguns próximos e outros distantes: Aurélio Prado, Carol Bueto, Cris Rodrigues, Grazy Feitosa, Josy Castro, Manuel DK, Marcus Vinícius, Nando Brito, Raphael Peralta, por terem me auxiliado, de forma direta ou indireta na conclusão dessa Dissertação e por serem tão indispensáveis à minha vida.

Às minhas colegas de Mestrado: Ana Gabriela e Ana Maria, pelos momentos de estudo e descontração.

À minha grande amiga Almair Alves Gonçalves (*in memorian*) pelo exemplo verdadeiro de vida!

À UFT, aos professores e a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical e todos os funcionários da EMVZ.

Aos Médicos Veterinários Juliano Franco e Luiz Henrique do Laboratório BRIO, por todo auxílio no desenvolvimento e execução do projeto.

Ao Diretor Antônio Augusto Fortes Simões Franco e à Coordenadora Ana Léa Moreira Martins da Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida (FESAR), por terem me liberado de minhas obrigações para com a instituição para a execução do meu projeto todas as vezes necessárias.

MUITO OBRIGADA!

*Nada é tão poderoso no mundo como uma idéia cuja oportunidade chegou.*

*Victor Hugo*

## BIOGRAFIA DA AUTORA

ANA CAROLINA BERNARDI MARIANI, filha de Maria Elisabeth Bernardi Mariani e Rogério Franco Mariani, nasceu em Ourinhos, Estado de São Paulo, aos 02 de outubro de 1978.

Concluiu o curso primário no Colégio Estadual Rio Branco, Estado do Paraná, na cidade de Santo Antônio da Platina, em 1988.

Na Escola Estadual Santa Teresinha, localizada em Santo Antônio da Platina, Estado do Paraná, concluiu o Ensino Fundamental, em 1992.

Em 1995, concluiu o Ensino Médio, no Colégio Santa Cruz de Araguaína, ingressando em 1998 na Escola de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Tocantins (UNITINS) e obteve o grau de Bacharel em Medicina Veterinária, em março de 2005, pela Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins . UFT.

Em março de 2007, iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical (Patologia Animal), nível Mestrado, na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Aspectos Anatômicos e Fisiológicos da Reprodução das fêmeas bovinas .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Estrutura Ovariana .....	15
1.2.2 Ciclo Estral .....	16
1.2.3 Endocrinologia da Reprodução de Fêmeas Bovinas .....	17
1.2.4 Dinâmica Folicular .....	18
<b>1.3 Produção <i>In Vitro</i> de Embriões Bovinos .....</b>	<b>22</b>
1.3.1 A OPU ( <i>ovum pick up</i> ) e a qualidade dos Oócitos a serem puncionados .	22
1.3.2 Maturação <i>In Vitro</i> (MIV) .....	24
1.3.3 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) .....	25
1.3.4 Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV) .....	26
<b>1.4 Sincronização de estro de receptoras bovinas .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Transferência de embriões bovinos .....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Diagnóstico de Gestação por Ultra-sonografia .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>38</b>
<b>2 RELAÇÃO ENTRE A MORFOLOGIA DO CORPO LÚTEO E ÍNDICES DE PRENHEZ EM RECEPTORAS BOVINAS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> DA RAÇA NELORE .....</b>	<b>38</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>38</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Materiais e Métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>46</b>
<b>3 INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA INOVULAÇÃO EM RECEPTORAS BOVINAS DE EMBRIÕES DA RAÇA NELORE PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Materiais e Métodos .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina  
CCOs: complexo cumulus oócito  
CIV: cultivo *in vitro*  
CL: corpo lúteo  
cm: centímetros  
CO<sub>2</sub>: gás carbônico  
D0: dia zero  
E<sub>2</sub>: estradiol  
FD: folículo dominante  
FIV: fertilização *in vitro*  
FSH: hormônio folículo estimulante  
G: gaules  
GnRH: hormônio gonadotrófico  
LH: hormônio luteinizante  
MHz: megahertz  
MIV: maturação *in vitro*  
µg/mL: microgramas por mililitros  
mmHg: milímetros de mercúrio  
ng: nanogramas  
O<sub>2</sub>: gás oxigênio  
OPU: ovum pick up  
P<sub>4</sub>: progesterona  
PIV: produção *in vitro*  
PVA: álcool polivinílico  
SFB: soro fetal bovino  
SOF: fluido de oviduto sintético  
TALP: Tyrode Albumin Lactate Piruvate  
TCM 199: Tissue Culture Medium 199  
TE: transferência de embriões  
TFTE: transferência de embriões em tempo fixo  
TR: taxa de recuperação

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DO DIA DO ESTRO EM RELAÇÃO A FIV E DA MORFOLOGIA DO CORPO LÚTEO NO DIA DA INOVULAÇÃO COM OS ÍNDICES DE PREENHEZ EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma biotécnica que vem se desenvolvendo rapidamente e com ela surgem novas perspectivas na reprodução e no melhoramento animal. Porém, um dos principais pontos na difusão dessa tecnologia diz respeito à taxa de gestação das receptoras. Um dos métodos utilizados na seleção de receptoras é a avaliação morfológica do corpo lúteo através da palpação retal. Após as inovulações as taxas de gestação são baixas, tornando a técnica cara e influenciando negativamente o produtor a decidir por essa técnica. Objetivou-se estimar o tamanho do corpo lúteo, palpado por via retal, no dia da inovulação, relacionando os diferentes tamanhos obtidos aos índices de prenhez e também, verificar a relação entre o dia do estro da receptora e o momento da fertilização *in vitro* de embriões com os índices de prenhez. Foram selecionadas 260 receptoras bovinas, mestiças no período de julho a novembro de 2008, sincronizadas com dois diferentes protocolos. As receptoras entraram em estro um dia antes, um dia após e no dia da fertilização *in vitro*. No dia da inovulação realizou-se a avaliação dos corpos lúteos por palpação retal, considerando-se o tamanho dos corpos lúteos, sendo esses classificados em pequenos, médios, grandes e inclusos. Os embriões foram inovulados no sétimo dia após a fertilização, por via transcervical no corno ipsilateral ao ovário que continha corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultra-sonografia aos 30 dias pós-inovulação. Das receptoras avaliadas, 46 apresentaram corpo lúteo pequeno, 80 médios, 114 tipo grandes e 20 inclusos, resultando em 16 (34,78%), 29 (36,25%), 41(35,96%) e 7 (35,00%) fêmeas gestantes, respectivamente. Para a segunda avaliação 40 receptoras tiveram cio observado um dia antes da fertilização *in vitro* (D-1), 137 no dia da FIV (D0) e 83 um dia após (D+1), resultado em uma taxa total de prenhez de 38,8%, sendo que para cada dia específico a taxa de prenhez resultante foi de 42,5 % para D -1; 41,61% para D0 e 30, 12 % para D +1. Esses resultados sugerem não haver relação entre morfologia do corpo lúteo de ovários de receptoras bovinas de embriões e os índices de prenhez. Também sugerem não haver relação entre o dia do estro da receptora inovulada e o dia da fertilização *in vitro* com os índices de prenhez.

**Palavras-chave:** fertilização *in vitro*; hormônios; transferência de embriões; zebuínos.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF ESTRUS DAYS IN RELATION IVF AND CORPUS LUTEUM MORPHOLOGY ON THE DAY INOVULATION WITH PREGNANCY INDICES IN RECIPIENT COWS OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

The *in vitro* production embryos bovine is a biotechnology that has been developing rapidly and with it come new perspectives on reproduction and animal breeding. One of main points in dissemination this technology relates to pregnancy indices in recipient cows. One of the methods used in selection in recipient cows is morphological evaluation of corpus luteum by rectal palpation. After inováções the pregnancy indices are low, making expensive technique as well as negatively influencing producer to decide by technique. The aim was to estimate the size of the corpus luteum by rectal palpated, on the day inoválation, relating different sizes obtained in pregnancy indices as well as to verify the relationship between estrus days of recipient cows and time fertilization *in vitro* of embryos with pregnancy indices. 260 crossbred recipient cows were selected, on the July to November of 2008, synchronized with two different protocols. Recipient cows beginning estrus on one day before, one day after and on the day *in vitro* fertilization. On the day inoválation was evaluated corpus luteum by rectal palpated, considering size of corpus luteum those was classified in small, medium, large and included. Embryos were inováados on the seventh day after fertilization by transcervical horn ipsilateral to the ovary containing corpus luteum. Diagnosis of pregnancy was performed by ultrasonography at 30 days postinoválation. Of recipient cows evaluated, 46 showed corpus luteum small, 80 medium, 114 large and 20 included, resulting in 16 (34.78%), 29 (36.25%), 41 (35.96%) and 7 (35, 00%) pregnant females, respectively. In second evaluation, 40 recipient cows beginning estrus one day before *in vitro* fertilization (D-1), 137 on the day of IVF (D0) and 83 one day after (D+1), resulting in an overall pregnancy indices of 38.8% and for each day pregnancy indices was 42.5% for D-1; 41.61, D0 and 30.12% for D+1. Results indicate no relationship between corpus luteum morphology of ovaries to recipient cows of bovine embryos and pregnancy indices. No relationship between estrus days of inoválation recipient cow and the day *in vitro* fertilization with pregnancy indices.

**Key-words:** embryo transfer, fertilization *in vitro*, hormones, Zebu

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos, o rebanho bovino brasileiro obteve um crescimento de 2,6% mesmo com todos os problemas enfrentados pelo setor pecuário, como por exemplo, a crise internacional, os problemas sanitários e o aumento de áreas utilizadas pela agricultura. Atualmente, o Brasil detém 16,1% do rebanho mundial, ou seja, um efetivo de 159,3 milhões de cabeças, e com isso ocupa um lugar de destaque no mercado mundial da carne (ANUALPEC, 2007).

Este rebanho é criado no sistema tradicional (extensivo) e nos sistemas modernos (intensivo e semi-intensivo). De modo geral, o sistema extensivo predomina nas regiões de terras mais baratas e o gado é criado disperso e com pouca assistência técnica. Nas regiões de terras mais valorizadas, que compreende parte das regiões sul e sudeste, o sistema é mais intensivo (ANUALPEC, 2007).

A região Norte do Brasil detém um efetivo de 41.060.384 cabeças. Os estados do Tocantins e Pará têm, respectivamente, 7.760.590 e 17.501.678 cabeças (IBGE, 2006).

Desde 2003, o Brasil se mantém como o maior exportador de carne no mundo, e assim deve estabelecer uma maior eficiência para atender esse mercado, bem como o mercado interno que está se tornando cada vez mais exigente (ANUALPEC, 2007).

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

O atraso na concepção ou a não concepção podem causar o descarte de matrizes por falhas reprodutivas. Fêmeas zebuínas possuem um período de gestação de aproximadamente 290 dias (FIGUEIREDO et al., 1997) e, considerando-se o objetivo de se obter um bezerro por ano, estas têm que

estabelecer uma nova gestação dentro de no máximo 70 a 80 dias pós-parto. No intervalo parto-concepção deve-se ainda descontar os dias em que está ocorrendo a involução uterina, que dura em média 40 dias (HAFEZ & HAFEZ, 2004), restando apenas algo em torno de 40 dias para que se estabeleça uma nova gestação.

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

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

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

A Produção *In Vitro* (PIV) de embriões vem apresentando grandes avanços e lentamente está sendo incorporada dentro da produção animal. Com o desenvolvimento do método de punção folicular *Ovum Pick Up* (OPU), possibilitou-se a recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro*, abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da TE clássica.

A Produção *in vitro* de embriões tem um grande potencial para acelerar o melhoramento genético de um rebanho bovino, assim como é uma importante ferramenta de pesquisa para a embriologia animal. Atualmente, bovinos de PIV representam uma porcentagem considerável do número total de embriões de animais de produção do mundo. É uma técnica extremamente versátil, pois pode ser aplicada em doadoras de todas as idades e não interfere no estado fisiológico da doadora, pois nenhuma estimulação hormonal é exigida (GALLI, et al, 2000).

A PIV é uma biotécnica que se refere à interação do espermatozóide com o ovócito no laboratório, com a formação de um novo indivíduo, permitindo a aceleração da produção de animais geneticamente superiores. Envolve as etapas de colheita, maturação (MIV) e fertilização (FIV) de oócitos e ainda o cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. É uma alternativa para aumentar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas de alto valor genético que possuam alterações que as impeçam de se reproduzir naturalmente (GONSALVES et al., 2002).

Levando em consideração de que com a inovulação de embriões de produção *in vitro* é possível alcançar uma taxa de prenhez de 50% e que pode-se usar, com êxito, animais que não respondem a tratamentos superovulatórios, podendo ser obtidos entre 25 a 50 terneiros/vaca/ano, a eficiência dessa biotécnica é de grande importância (PALMA et al., 1998).

Assim, a utilização de biotécnicas como transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões, são alternativas que podem ser utilizadas comercialmente para a melhoria da eficiência reprodutiva concomitante ao progresso genético dos rebanhos bovinos do Brasil.

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2 Aspectos Anatômicos e Fisiológicos da Reprodução das Fêmeas Bovinas

#### 1.2.1 Estrutura Ovariana

Os ovários são órgãos pares do sistema reprodutor feminino, com localização e tamanho variando entre as espécies (NASCIMENTO et al., 2003; RAMOS et al., 2008). Nos bovinos, as gônadas têm em média 3,0 a 4,5 cm de comprimento, 1,5 a 2,0 cm de largura e 2,0 a 2,8 cm de espessura (SISSON & GROSSMAN, 1981), com coloração rósea clara devido à túnica albugínea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). São os órgãos primários para a reprodução na fêmea, exatamente como os testículos no macho, e podem ser considerados de natureza endócrina e citogênica (produtora de células), já que produzem hormônios que são absorvidos diretamente pela corrente sanguínea, e também, óvulos que são expelidos por estas glândulas (ALVIN & FILADELPHO, 2005; FRANDSON, 1979).

Os ovários são revestidos pelo epitélio superficial, contínuo com o mesovário. Sob o epitélio há uma cápsula de tecido conjuntivo denso . *a tunica albugínea ovarii*. Abaixo da albugínea, o ovário é formado por uma camada externa, o córtex (zona parenquimatosa), e uma camada interna, a medular (zona vascular). O córtex contém folículos, corpos lúteos e estroma com seus vasos sanguíneos e linfáticos. A medula é constituída por grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (BANKS, 1992; RAMOS et al., 2008).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: *a*) folículos pré-antrais ou não cavitários e *b*) folículos antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos. Na categoria de folículos pré-antrais são incluídos os folículos primordiais, intermediários, primários e secundários. O ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não chega até à ovulação, mas ao contrário, é eliminada por meio de um processo conhecido por atresia folicular (FIGUEIREDO, et al., 2007).

O corpo lúteo (CL) participa da maioria dos processos reprodutivos. Ele é um órgão endócrino transiente formado da ruptura do folículo ovulatório e sua função primária é a produção de progesterona, a qual prepara o endométrio para implantação e manutenção da gestação inicial. Se a prenhez não ocorrer, o CL regride para permitir o início de um novo ciclo estral (MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000; SAKAMOTO et al., 1995; WEBB et al., 2002; WILTBANK, 1994).

O CL se desenvolve a partir das células residuais do folículo pré-ovulatório. Antes da ovulação, o folículo é organizado em distintas camadas. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal, que acima dela encontram-se a teca interna e externa (MILVAE et al., 1996).

### 1.2.2 Ciclo Estral

O ciclo estral resulta da interação coordenada dos tecidos do sistema nervoso central, hipotálamo-hipófise, ovário e útero. A comunicação entre órgãos ocorre principalmente mediante os hormônios GnRH (hipotálamo), LH (hipófise) e FSH (hipófise), estradiol e progesterona (ovário) e prostagladina F2 (útero) (GONZÁLEZ, 2001).

Segundo Hafez & Hafez (2004), as fêmeas bovinas são animais poliéstricos anuais, ou seja, apresentam vários ciclos estrais ao longo do ano. Ciclo estral é o conjunto de fenômenos ocorridos entre dois episódios de estro.

A justificativa evolutiva da atividade cíclica é prover à fêmea oportunidades sucessivas de se tornar gestante e com isso perpetuar a espécie. Essa atividade cíclica depende de um complexo mecanismo, orquestrado pelo sistema nervoso central que exerce o controle do sistema reprodutivo (BINELLI et al., 2006).

Nas vacas, o ciclo estral varia de 17 a 25 dias, com intervalos médios de 20 dias para novilhas e 22 dias para vacas (SIROIS & FORTUNE, 1988).

O ciclo estral foi dividido em estágios que representam eventos comportamentais ou gonadais. A terminologia criada para denominar estes estágios é a seguinte: proestro - período de desenvolvimento folicular; estro - período de receptividade sexual; metaestro . período de desenvolvimento inicial do corpo lúteo; diestro - período da fase madura do corpo lúteo (MARQUES et al., 2008).

Durante a fase do estro, as fêmeas bovinas apresentam manifestações comportamentais caracterizadas por imobilidade durante a monta, comportamento homossexual, descarga de muco vaginal, mugidos freqüentes, intensa movimentação, aumento na freqüência de micção, entre outras características que são usadas para a detecção convencional do estro (BARUSELLI, 2007).

Em bovinos, a duração média do estro é de, aproximadamente, 12 horas, e a ovulação ocorre de 12 a 16 horas após o término do cio. A duração do cio e o momento de ovulação apresentam pequenas variações entre fêmeas da mesma espécie, em função de fatores endógenos e exógenos (VALLE, 1991).

O ciclo estral dos bovinos pode ser dividido em duas fases distintas. A primeira, fase folicular é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo, estrutura no ovário que contém o óvulo, e culmina com a liberação do mesmo (ovulação). A segunda, denominada de fase luteínica, é caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo. Esta estrutura, formada após a ruptura do folículo, produz progesterona, que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. Se o óvulo for fertilizado, o corpo lúteo será mantido caso contrário ocorrerá a regressão do corpo lúteo e terá início uma nova fase folicular (VALLE, 1991).

### 1.2.3 Endocrinologia da Reprodução de Fêmeas Bovinas

A fisiologia do ciclo estral é complexa e depende da perfeita interação entre o sistema nervoso central, sistema endócrino e os órgãos genitais, útero e ovário (BALL & PETERS, 2006).

De acordo com Hafez & Hafez (2004), o hipotálamo é responsável pela produção de GnRH que atua na hipófise anterior provocando a liberação de hormônios gonadotróficos, o LH e o FSH.

O FSH promove crescimento folicular e hiperplasia nas células da granulosa e teca interna nos ovários, enquanto o LH induz a maturação e ovulação dos folículos, produção de estrógenos pela teca interna e luteinização desta e da granulosa com desenvolvimento do corpo lúteo (RUMPF et al., 2000).

O 17 -estradiol ( $E_2$ ) produzido pelas células dos folículos ovarianos é o principal hormônio estrogênico da fêmea e é liberado sob o controle do FSH e do LH. Quando produzido na presença do folículo dominante, é o responsável pela

retroalimentação positiva ao LH e negativa ao FSH. Na ausência de progesterona, induz o pico pré-ovulatório de LH e também o comportamento do estro (FERRAZ et al., 2008).

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

A PGF2 (prostaglandina F2), produzida pelo endométrio uterino (OKUDA et al., 2002), caso não haja a fecundação, inicia a regressão do corpo lúteo. O declínio da produção de progesterona facilita a liberação da prostaglandina (SWANSON, 1988).

Em ruminantes, a ocitocina constitui um dos hormônios que determinam a luteólise. A inibina induz a um bloqueio na liberação de FSH retardando o desenvolvimento folicular (BERTAN et al., 2006).

#### 1.2.4 Dinâmica Folicular

O folículo ovariano é uma estrutura altamente organizada e basicamente constituída pelo oócito, circundado por células foliculares e demarcado por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano. É considerado a unidade morfofuncional do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, maturação oocitária e produção de hormônios (CORTVRINDT E SMITZ, 2001; SANTOS et al., 2008).

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (MARTINS, et al., 2008).

Os folículos pré-antrais representam mais de 90% da população folicular do ovário e podem ser classificados em unilaminares (primordiais e primários) e multilaminares (secundários), de acordo com o número de camadas de células da

granulosa circundando o oócito. Os folículos primordiais se encontram em estágio de quiescência e são compostos de um oócito imaturo circundado por uma única camada de células da granulosa de forma pavimentosa. Os folículos primários são constituídos de um oócito em crescimento circundado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide, não possuindo células tecais diferenciadas e podendo apresentar uma zona pelúcida em formação. Os folículos secundários são caracterizados por um oócito inteiramente circundado por uma zona pelúcida e a presença de pelo menos duas camadas de células da granulosa de forma cubóide. Ao contrário dos folículos primordiais, os folículos primários e secundários são considerados folículos em estágio inicial de crescimento (SANTOS, et al., 2008).

Os folículos antrais compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Estes folículos são constituídos por um oócito circundado pela corona radiata e células do *cumulus* que conectam o oócito às células da granulosa, além das células tecais e uma cavidade contendo líquido folicular. Os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos folículos terciários, contudo o oócito apresentar-se-á maturo e no estágio final do desenvolvimento folicular. De toda a população folicular presente no ovário, apenas cerca de 0,1% destes atingirá a ovulação, enquanto os demais folículos serão perdidos+via atresia durante o desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2008).

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e pré-ovulatório). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa. Nesse processo, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa de formato cúbico, tornam-se folículos de transição, caracterizados pela presença de células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico e, em seguida, folículos primários, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico. Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente. Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais, bem como os mecanismos envolvidos na variação do período de início do crescimento folicular são ainda enigmáticos e representam uma das maiores questões relacionadas com a biologia ovariana (MARTINS, et al., 2008).

O número de folículos em fase antral varia ao longo do ciclo estral, em função do padrão de crescimento folicular característico dos bovinos. Cada onda de crescimento folicular é caracterizada pela mobilização de um conjunto de folículos entre dois e quatro milímetros, diâmetro que também coincide com o estágio no qual o oócito adquire competência para sofrer maturação, meiose e manter o posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*. Nesta fase, o estabelecimento da dominância folicular é o principal fator afetando a qualidade do pool de folículos em desenvolvimento (VIANA, 2005).

A ativação, ou seja, a saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento, é a primeira e essencial etapa em que os folículos primordiais deixam o estágio de repouso e iniciam seu crescimento. Os mecanismos precisos que controlam o início e a progressão do crescimento folicular estão ainda sendo investigados (MARTINS, et al., 2008).

Durante um ciclo estral, ocorrem normalmente duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas, sendo apenas a última onda ovulatória. O folículo ovulado passa por mudanças funcionais e estruturais e origina o corpo lúteo, que se desenvolve rapidamente, secretando quantidades crescentes de  $P_4$ . Por volta do dia 18 do ciclo, o processo de luteólise causa regressão do corpo lúteo e conseqüente queda nas concentrações plasmáticas de progesterona. Cada onda folicular é caracterizada pelas fases de recrutamento, seleção e dominância (BINELLI, 2006).

O folículo dominante (FD) de uma onda tem dois destinos possíveis. Na presença de  $P_4$  o FD entra em regressão ou atresia. Após a luteólise, o FD escapa à atresia e ovula. Se não houver fertilização do ovócito ovulado, o ciclo se repetirá. Em uma determinada onda, cada fase de crescimento folicular é controlada por mecanismos específicos. O início de uma onda de crescimento folicular depende do término da onda que a precedeu (ADAMS et al., 1992; BINELLI, 2006).

Com a atresia ou ovulação do FD anterior, concentrações plasmáticas de inibina e estradiol-17 são reduzidas, resultando na liberação de um pico de FSH pela hipófise anterior e no recrutamento de uma nova onda (ADAMS et al., 1992). O recrutamento consiste do crescimento de um grupo de folículos em resposta ao FSH. Conforme os folículos vão crescendo, aumenta sua capacidade de produção de  $E_2$  e inibina, que suprimem gradualmente a liberação de FSH (GIBBONS et al., 1997). As concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atresia. A seleção folicular é o ajuste do

número de folículos recrutados para o número de folículos ovulados normalmente, em um ciclo estral, por uma determinada espécie, ou seja, um no caso dos bovinos. Assim, dentre os folículos recrutados em cada onda, apenas um é selecionado por conseguir continuar a crescer sob concentrações limitantes de FSH (BINELLI, 2006).

Através da ultra-sonografia, pode-se definir a seleção pelo momento do ~~desvio~~ desvio folicular, que é o momento no qual o folículo selecionado passa a ter uma taxa de crescimento maior que os outros folículos recrutados na mesma onda (GINTHER et al., 2001). Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo provido por uma outra gonadotrofina hipofisária, o LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2001). Em resposta ao LH o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir  $E_2$  e inibina aumenta. Tal fato leva as concentrações de FSH ao nadir e o folículo selecionado se torna dominante (BINELLI, 2006).

Define-se dominância, como sendo a capacidade de um folículo inibir o crescimento dos demais. A taxa de crescimento do FD é maior quanto maior for a frequência de pulsos de LH, sendo que esta é controlada diretamente pelo neuro-hormônio hipotalâmico GnRH. A frequência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, de LH é inversamente proporcional às concentrações de  $P_4$  circulante. Durante a fase luteínica do ciclo estral a frequência de pulsos de LH é insuficiente para estimular a diferenciação final e ovulação do FD. Ao entrar em atresia o FD perde a dominância e ocorre recrutamento de uma nova onda, como mencionado acima. Alternativamente, na fase folicular do ciclo, com a ausência de  $P_4$  ocorre aumento na frequência de pulsos de LH que estimula a liberação de quantidades crescentes de  $E_2$  pelo FD. O  $E_2$  induz mudanças de comportamento associadas ao estro e induz a liberação de um pico pré-ovulatório de GnRH, seguido por um pico de liberação de LH que causa a ovulação do FD (BINELLI, 2006).

A formação do CL inicia-se por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas nas células da teca e da granulosa do folículo pré-ovulatório, fenômeno que ocorre devido à elevação do hormônio luteinizante (LH). A progesterona ( $P_4$ ) produzida pelo CL exerce diversos efeitos biológicos em tecidos alvos do organismo. Existem associações entre embriões considerados pequenos e baixas concentrações circulantes de  $P_4$  e vacas gestantes apresentando concentrações séricas de  $P_4$  acima de 4,0 ng/mL. Embora seja esperado que o tamanho do CL

influencie a secreção de P<sub>4</sub>, são poucos os experimentos com uma avaliação crítica dessa possível relação (VIEIRA et al., 2002).

### 1.3 Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

A produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica recente que visa a obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo da fêmea. Envolve a coleta de oócitos dos folículos ovarianos, completando três etapas biológicas: Maturação *in vitro* de oócitos (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV), e o Cultivo *in vitro* (CIV) (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

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

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

#### 1.3.1 A OPU (*ovum pick up*) e a Qualidade dos Oócitos

Segundo Galli et al. (2000), a produção *in vitro* de embriões tem se desenvolvido muito nos últimos anos, mas um maior incremento na proporção de

embriões produzidos *in vitro* ocorreu através da utilização de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (*ovum pick up* . OPU).

A técnica de aspiração folicular orientada por ultra-sonografia (OPU), foi desenvolvida na década de 80, para atender à demanda por um procedimento para coleta de complexo *cumulus*-oócito (CCO) que fosse menos traumática que as abordagens cirúrgicas ou por laparoscopia até então utilizada. Dentre as vantagens reconhecidas da técnica, está o fato de ser pouco invasiva, não depender de pré-estimulação hormonal, pode ser usada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial (VIANA & BOLS, 2005).

A OPU é uma técnica muito versátil pois permite a utilização de animais muito jovens, a partir de dois a 3 meses, ou muito velhos. Também pode ser utilizada em vacas secas, em lactação ou prenhes. Não interfere no estado fisiológico do animal, não requer estimulação hormonal exógena e pode ser executada duas vezes por semana (GALLI et al., 2000). Pode ainda ser usada para gerar produtos adicionais de uma vaca de alto valor que não responda mais aos tratamentos utilizados nas coletas de embriões, também naquelas que apresentam infertilidade adquirida devido a patologias no trato reprodutivo, impossibilitando a fecundação e o desenvolvimento embrionário *in vivo* (BOLS et al., 2005).

Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da produção *in vitro* de embriões. O tamanho do folículo de origem e a extensão e integridade das células do *cumulus* influenciam a competência oocitária. Folículos maiores, 6 mm, (milímetros) contêm oócitos com maior potencial para tornarem-se blastocisto, enquanto folículos pequenos (<3 mm) contêm oócitos incompetentes. (RAMOS et al., 2006).

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

compactada as células do *cumulus*, mais irregular o citoplasma, menor a qualidade e menor serão as taxas de clivagem (BOLS et al., 2005).

A taxa de sucesso da OPU é medida parcialmente pela taxa de recuperação (TR = número de oócitos a cada 100 folículos puncionados), a qual é entre outros fatores, influenciada pela visualização dos folículos, pelo diâmetro da agulha e nível do vácuo da aspiração, e pela experiência do operador. Como resultado, as taxas de recuperação variam muito. Recentes avanços na tecnologia de ultra-som têm aumentado a resolução de imagem e a qualidade da visualização dos ovários (BOLS et al., 2005).

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

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

O transporte dos oócito após a colheita até o Laboratório é possível de ser realizado e deve ser efetuado em um período de aproximadamente 10 a 12 horas (GONSALVES, et al. 2002).

### 1.3.2 Maturação *In Vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* inicia-se com a chegada dos oócitos aspirados ao laboratório, onde estes são mantidos em um meio de maturação. O período

necessário para a maturação nuclear varia entre as espécies, onde para a espécie bovina a maturação nuclear do oócito requer um período de 18 a 22 horas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O meio de cultura utilizado para a maturação de oócitos é o TCM 199 acrescido de 10% de soro bovino, FSH, LH, estradiol e EGF. A maturação é feita dentro de incubadoras convencionais de CO<sub>2</sub> no interior de placas de Petri (GALLI et al., 2000).

A maturação do oócitos bovinos é realizada a 39°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (GONSALVES et. al., 2002).

### 1.3.3 Fertilização *in vitro* (FIV)

Terminada a etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Para que isto ocorra o sêmen deve passar pelas etapas de separação espermática e capacitação espermática. Após a capacitação dos espermatozóides, retira-se da estufa a placa de Petri contendo os ovócitos maturados e depositam-se os espermatozóides, sempre procurando proporcionar um ambiente adequado (GONSALVES *et al.*, 2002). O dia da fertilização é considerado como o dia zero (D0).

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

A fusão do oócito com o espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do espermatozóide e a

membrana plasmática do oócito. Após a penetração espermática, ocorre a segunda divisão meiótica e os cromossomos que permaneceram no oócito são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino. De forma concomitante, a membrana nuclear do espermatozóide se desintegra, a cromatina nuclear descondensa pela remoção de proteínas nucleares espermáticas específicas e ocorre a formação de nova membrana nuclear que envolve os cromossomos paternos, formando o pró-núcleo masculino (GONSALVES et. al., 2002).

#### 1.3.4 Cultivo *In Vitro* (CIV)

O tempo de cultivo *in vitro* varia de D7-D9 (8-10 dias após a FIV), dependendo do objetivo da rotina de FIV, em temperatura de 38,8°C com atmosfera controlada (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) e umidade saturada (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

É necessário, no cultivo embrionário, o uso de meios simples que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. A composição do meio é baseada nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação. O 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 (GONSALVES 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. No entanto, embriões cultivados em meios totalmente definidos, normalmente sofrem bloqueio no desenvolvimento e redução da viabilidade em relação àqueles cultivados em meios suplementados com BSA e SFB (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996). Outros estudos demonstraram que a substituição de SFB e BSA por PVA proporciona baixo desenvolvimento embrionário, particularmente no estágio de blastocisto, sugerindo que o desenvolvimento de mórula para blastocisto exige fatores adicionais exógenos que podem ser encontrados no SFB, que provavelmente estimula diferenciação e a proliferação celular (LIM et al., 1999).

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

#### **1.4 Sincronização de Estro de Receptoras Bovinas**

Em bovinos, os protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem a inseminação artificial (IA) em momento pré-determinado, superestimulação ovariana e sincronização de receptoras para TE, potencializando a eficiência reprodutiva (BURATINI JR, 2007).

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. Os métodos disponíveis para o tratamento de receptoras de embriões incluem a indução de estro com o uso da prostaglandina F<sub>2</sub> 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. Entretanto, existem algumas condições imprescindíveis para seu uso, tais como, a detecção do corpo lúteo por palpação retal ou ultra-sonografia e observação do comportamento estral nos dias subsequentes ao tratamento (BARREIROS et al., 2006).

Os protocolos com benzoato de estradiol e progesterona intravaginal por um período de 7 a 9 dias permitem a sincronização do crescimento folicular e o crescimento de uma nova onda folicular 4 a 5 dias após o início do tratamento. No momento da retirada dos dispositivos a administração de uma dose luteolítica de PGF<sub>2</sub> ou seus análogos e de uma dose de 0,5 a 1 mg (miligrama) de benzoato de estradiol, 24 horas depois, asseguraram a ocorrência de ovulação (BARREIROS et al. 2006).

Em razão de taxas adequadas de ovulação, o uso destes protocolos permite a transferência de embriões em tempo fixo sem prévia observação de cio, empregando apenas a avaliação do corpo lúteo no momento da inovulação dos embriões. Além de facilitar consideravelmente o manejo, as taxas de aproveitamento estão em torno de 70% dos animais tratados para protocolos de TETF (BARREIROS et al., 2006).

### **1.5 Transferência de embriões bovinos (TE)**

A técnica de transferência de embriões em bovinos vem se desenvolvendo rapidamente e com ela surgem novas perspectivas para reprodução e melhoramento animal. Num programa de TE, geralmente, tem-se um cuidado extremado com as doadoras e relegam-se as receptoras a um segundo plano. Porém, um dos principais pontos de estrangulamento na difusão dessa tecnologia diz respeito à taxa de gestação das receptoras. Após a transferência de embriões classificados como morfológicamente viáveis, ou seja, que apresentam apenas pequenas anormalidades estruturais, e que teoricamente teriam condições de continuar o seu desenvolvimento no útero da receptora, a taxa de gestação situa-se em torno dos 55% (FERNANDES, 1999). Com isso, tem-se uma perda de aproximadamente metade dos embriões coletados, o que representa uma elevação substancial no custo de cada produto, influenciando negativamente o produtor no momento de decidir em adotar essa técnica. Além dos aspectos inerentes ao embrião, à mãe e ao ambiente, as variáveis relacionadas ao método de inovulação também são de decisiva importância na taxa de gestação das receptoras (SREENAN & DISKIN, 1987).

A transferência de embriões pode ser feita de forma cirúrgica ou não cirúrgica. Embora os índices de prenhez sejam mais elevados com transferências cirúrgicas em bovinos, são necessárias melhores instalações e melhor treinamento. A transferência não cirúrgica é mais adaptada para uso em fazendas e tem se tornado quase tão simples de executar como a inseminação artificial (MAPLETOFT & STOOKEY, 1999). Para Gonsalves et al. (2002), a transferência deve ser feita, de preferência, por via transcervical.

A taxa de gestação de receptoras após inovulações não cirúrgicas é geralmente inferior quando comparada a inovulações cirúrgicas pelo flanco. A despeito dessa afirmação, a técnica de inovulação não cirúrgica vem ganhando espaço devido à sua rapidez, sua facilidade e ao menor custo, o que pode compensar uma taxa de gestação ligeiramente inferior das receptoras. Uma das variáveis que mais interfere nessa diferença é a habilidade do operador. Em inovulações não cirúrgicas, variáveis como tempo necessário para transpor a cérvix, possibilidade de inoculação de microorganismos no lúmen uterino, local de deposição do embrião e grau de lesão interna do útero afetam a taxa de gestação. Além da experiência do operador, essas variáveis podem ser influenciadas pelas características morfológicas da cérvix, pelos cuidados com higiene, pela contenção da receptora no momento da inovulação e pela possibilidade de manipulação uterina durante o processo (FERNANDES, 1999).

Apesar de não ser requerida uma avaliação de qualidade zootécnica da receptora é fundamental que ela possua porte compatível com a raça do embrião a ser transferido garantindo uma gestação e parto normal, livre de auxílio obstétrico (ANDRADE et al., 2002). Entretanto, a seleção final de uma fêmea como receptora somente deve ocorrer no dia da transferência do embrião, baseado nos sinais de estro evidenciados após a sincronização e da avaliação do corpo lúteo funcional (GONSALVES et al., 2002).

Antes da transferência, o embrião precisa ser acomodado no centro de uma palheta de 0,25 ml, contendo meio de cultivo. O envasamento na palheta é feito de tal forma que uma coluna central contendo o embrião encontra-se separada das colunas nas extremidades por duas colunas de ar. As palhetas precisam ser devidamente identificadas para se evitar equívocos no momento da inovulação. Somente embriões de graus um e três devem ser transferidos para as receptoras (GONSALVES et al., 2002).

As receptoras devem ser submetidas à anestesia peridural baixa com três a quatro mililitros de anestésico local à base de lidocaína a 2% (ANDRADE et al., 2002). A dose da anestesia local é ajustada para assegurar que a fêmea permaneça de pé ao longo da TE (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Após anestesia realiza-se higienização ao redor da vulva, ânus e inserção da cauda, com água e sabão, com posterior anti-sepsia utilizando álcool iodado a 10% e álcool etílico (GAMBARINI, 2004).

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

### **1.6 Diagnostico de Gestação por Ultra-sonografia**

A utilização da ultra-sonografia de rotina na reprodução animal teve início apenas na década de 80, com os trabalhos de ARCHIBONG & DIEHL (1982) utilizando o ultra-som tipo Doppler, e, CHAFFAUX et al. (1982), PIERSON & GINTHER (1984) e REEVES et al. (1984) usando o ultra-som do tipo modo-B.

O nível de acurácia do diagnóstico de gestação varia muito e depende de alguns fatores, tais como: o tipo de transdutor utilizado (linear ou setorial), a frequência do transdutor, a frequência do exame (uma ou várias vezes), a idade, a raça e o número de parições dos animais, o número de dias pós-inseminação, o exame dos ovários, e a experiência e as condições de trabalho do técnico (BADTRAM et al., 1991; RAJAMAHENDRAN et al., 1994).

Em Medicina Veterinária, as frequências mais comumente utilizadas são de 3, 5,5 ou 7,5 MHz, desta forma, a resolução das imagens geradas por equipamentos de 3,5 MHz, apesar de apresentarem imagens em torno de 12 a 15 cm de profundidade só permitem a visualização de estruturas de 6 a 8 mm e, portanto, a qualidade das imagens geradas é inadequada para a visualização de estruturas menores que 6 mm, servindo para as avaliações de gestações mais tardias. Já os equipamentos de 5 MHz são suficientes para a identificação de estruturas de 3 a 5 mm e a uma profundidade de 8 a 10 cm, tornando-se ideais para os exames rotineiros do trato genital dos grandes animais e em gestações iniciais. No entanto, para aumentar a qualidade das imagens podem ser utilizados transdutores de 7,5 MHz, com a profundidade ficando restrita à apenas 4 a 5 cm, mas de ótimo uso para a avaliação de estruturas próximas ao transdutor (KÄHN, 1994; MOURA & MERKT, 1996).

## REFERÊNCIAS

ADAMS GP, MATTERI RL, KASTELIC JP, KO JCH, GINTHER OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 94, p.177-188, 1992.

ALVIN, N. C.; FILADELPHO, A. L. Avaliação do ganho de peso e da cobertura de gordura na carcaça de novilhas castradas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 5, 2005.

ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.

ANUALPEC: **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo, SP: FNP, 2007.

ARCHIBONG, A.E.; DIEHL, J.R. Evaluation of an ultrasonic amplitude depth analysis technique for pregnancy diagnosis in the cow. **Am. Vet. J.**, v.43, n.4, p.711-4, 1982.

BADTRAM, G.A.; GAINES, J.D.; THOMAS, C.B. et al. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1153-67, 1991.

BALL, P.J.H.; PETERES, A.R. **Reprodução em Bovinos: Ciclo ovariano**. 3.ed. São Paulo- SP: 38p., A.R, 2006.

BANKS, J.W. **Histologia veterinária aplicada**.2.ed. São Paulo: Manole, 1992.

BARREIROS, T. R. R., BLASCHI, W., BORSATO, E. A., LUDWIG, H. E., SILVA, D. R. M., SENEDA, M. M. Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolos de sincronização com clorprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 657-664, out./dez. 2006.

BARUSELLI, P. S., GIMENES, L. U., SALES, J. N. S. Fisiologia Reprodutiva de Fêmeas Taurinas e Zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n.2, p. 205-211, 2007.

- BERTAN, C. M., BINELLI, M., MADUREIRA, E. H., TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise . revisão de literatura. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.
- BINELLI, M., IBIAPINA, B. T., BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.34 (supl 1), 1-7, 2006.
- BOLS P.E.J.; LEROY J.L.M.R. & VIANA J.H.M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, p. 103-118, suplemento 1, 2005.
- BURATINI JR, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, abr./jun. 2007.
- CHAFFAUX, S.; VALON, F.; MARTINEZ, J. Evolution de l'image échographique du produit de conception chez la vache. Bull, Acad. **Vét. France**, v.55, p.213-221, 1982.
- CORTVRINDT R, SMITZ JEJ. In vitro follicle growth: achievements in mammalian Species. **Reprod Dom Anim**, v.36, p.3-9, 2001.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- FERNANDES, C. A. C. Inovações não cirúrgicas e taxa de gestação em receptoras de embrião. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. Belo Horizonte, v. 51, n 3, 1999.
- FERRAZ, H.T., VIU, M.A.O., LOPES, D.T., et al. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **PUBVET**, v.2, n.12, 2008.
- FIGUEIREDO, J. R., CELESTINO, J. J. H., RODRIGUES, A. P. R., SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, 2007, p.143-152.

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

FRANDSON, R.D. **Anatomia e fisiologia dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, p.291-298.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2000.

GAMBARINI, M. L. M. **Curso de transferência de embriões em bovinos**. Goiânia: UFG, 2004.

GIBBONS JR, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biol Reprod**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER OJ, BEG MA, BERGFELT DR, DONADEU FX, KOT K. Follicle selection in monovular species. **Biol Reprod**, n. 65, p. 638-647, 2001.

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

GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia da Reprodução. 65p. 2001. Disponível em: [www.ufrgs.br/favet/bioquimica](http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica), acesso em: 20/11/2008.

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

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Barueri: Editora Manole, 513 p., 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br> Acesso em: 23/09/2008.

JUNQUEIRA L.C. & CARNEIRO J.C. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KÄHN, W. **Veterinary Reproductive Ultrasonography**, Mosby-Wolfe, London, p.256, 1994.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol. Reprod.**, v.55, p.333-339,1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub>.in air or in 5% O<sub>2</sub>., 5% CO<sub>2</sub>. and 90% N<sub>2</sub>. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

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

MAPLETOFT, R. J.; STOOKEY, J. M. **Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção in vivo de embriões**. In: International Embryo Transfer Society. USA, abril, 1998. Trad.OLIVEIRA FILHO, E. B. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Uberlândia: SBTE, Cap. 4, p.57-70, 1999.

MARQUES, J.A., PRADO, I.N., ZAWADZKI, F., MAGGIONI, D. **Os hormônios da reprodução e o desempenho de fêmeas**. PUBVET, V.2, N.6, Fev2, 2008.

MARTINS, F. S., SILVA, J. R. V., REDRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008.

MILVAE, R. A., Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF2 in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v.5, 2000, p.1-5.

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

MOURA, J.C.A.; MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução eqüina**. 2 ed., Salvador: Editora Universitária Americana, 162 p.,1996.

NASCIMENTO A.P., PINHEIRO N.L., SALES A. & VIANA J.H. Correlação morfológica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p. 126-132, 2003.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSK, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin F<sub>2</sub> synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.255-264, 2002.

PALMA, G.A.; ALLER, J.; ALBERIO, R. Aplicación de la producción in vitro de embriones en producción lechera. In: ENCONTRO SUL AMERICANO DE PECUÁRIA DE LEITE, 1, Pelotas - RS, dezembro, 1998.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography appearance of the bovine uterus during the estrus cycle. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.190, n.8, p.995-1001, 1984.

RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, D.J.; BURTON, B. Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction: A review. **Can. Vet. J.**, v.35, p.563-72, 1994.

RAMOS, A. A., FERREIRA, A. M. SÁ, W.F., CAMARGO, J.H.M., HENRY, M. R. J. M. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec**, v.58, n.3, p.341-347, 2006.

RAMOS, E. M., CAVALCANTE, T. V., NUNES, R. R. M., OLIVEIRA, C. M., SILVA, S. M. M. S., DIAS, F. E. F., MARUO, V. M., ARRIVABENE, M. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.4, p. 696-702, out/dez, 2008.

REEVES, J.J.; RANTANEN, N.W.; HAUSER, M. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. **Theriogenology**, v.21, p.485-94, 1984.

RUMPF, R; BEM, D.E.; PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA . Recursos genéticos e biotecnologia, 2000, p. 71-103.

SAKAMOTO, K., MIWA, K., EZASHI, T., OKUDA-ASHITAKA, E., OKUDA, K., HOUTANI, T., SUGIMOTO, T., ITO, S., HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandin F<sub>2</sub> receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, 1995, p. 99-105.

SANTOS, R. R., CELESTINO, J. J. H., LOPES, C. A. P., MELO, M. A. P., RODRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.9-15, jan./mar. 2008.

SARTORI, R., FRICKE, P. M., FERREIRA, J. C., GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol Reprod** 2001;65:1403-09.

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

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

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

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

SREENAN, J.M., DISKIN, M.G. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v.27, p.99-113, 1987

SWANSON M. J. Dukes - **Fisiologia dos animais domésticos**. Ed.Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. Brasil. 799 p. 1988.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Bio. Reprod.**, Champaign, v.62, p.206-213, 2000.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.227-238, 1996.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos . a decade of achievement. **Animal reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

VALLE, E.R.do. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo.Grande: EMBRAPA- -CNPGC, 1991. 24p.

VIANA, J.H.M., BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33 (Supl 1): 1-4, 2005.

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

WEBB, R., WOAD, D.G., ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic animal endocrinology**, v. 5339, p. 1-9, 2002.

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

WILTBANK, M.C. J Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

## CAPÍTULO II

### RELAÇÃO ENTRE O TAMANHO DO CORPO LÚTEO E ÍNDICES DE PRENHEZ EM RECEPTORAS BOVINAS INOVULADAS COM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* DA RAÇA NELORE.

#### Resumo

A avaliação morfológica do corpo lúteo antes da inovulação é um método utilizado na seleção das receptoras bovinas. Objetivou-se verificar a relação entre o tamanho do corpo lúteo, estimado por palpação retal no dia da inovulação, e os índices de prenhez. Foram selecionadas 260 receptoras bovinas, mestiças, no período de julho a novembro de 2008, sincronizadas com dois diferentes protocolos. O primeiro composto pelo hormônio prostaglandina e o segundo composto pelos hormônios norgestomet, benzoato de estradiol, gonadotrofina sérica equina e cloprostenol sódico. No dia da inovulação avaliaram-se os corpos lúteos, por palpação retal, sendo esses classificados em tipo 1 (pequeno), 2 (médio), 3 (grande) e IN (incluso) considerando-se a ocupação total do tecido luteal na superfície do ovário, sendo esses classificados em tipos 1, 2, 3 e incluso, ou seja pequenos, médios e grandes. As inovulações foram realizadas via transcervical, no corno ipsilateral ao ovário que continha corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi através de ultra-sonografia aos 30 dias pós-inovulação. Das receptoras avaliadas 46 apresentaram corpo lúteo do tipo 1, 80 do tipo 2, 114 tipo 3 e 20 do tipo incluso, resultando em 16 (34,78%), 29 (36,25%), 41 (35,96%) e 7 (35,00%) fêmeas gestantes, respectivamente. O índice total de prenhez foi de 35,77%. Esses resultados sugerem não haver relação entre morfologia do corpo lúteo de ovários de receptoras bovinas de embriões PIV e os índices de prenhez.

**Palavras-chave:** ovário, palpação retal, produção *in vitro*, zebu

## ABSTRACT

### **Relationship between size of corpus luteum and pregnancy indices in recipient cows inoovulated with embryos *in vitro* produced of Nellore.**

Morphological evaluation of corpus luteum before inoovulação is method used in selecting recipient cows. The aim was investigating relationship between size of corpus luteum, estimated by rectal palpation on the day inoovulação, as well as pregnancy indices. 260 crossbred recipient cows were selected in the period July to November of 2008, synchronized with two different protocols. The first with hormone prostaglandin, and second norgestomet, estradiol benzoate, and equine serum gonadotrophin sodium cloprostenol. On the day inoovulação was evaluated corpus luteum by rectal palpation, classified ins type 1 (small), 2 (medium), 3 (huge) and IN (included) considering total occupation of luteal tissue on ovarian surface, and classified as types 1, 2, 3 and included, i.e. small, medium and great. Inoovulações were transcervical in horn ipsilateral to the ovary containing corpus luteum. The diagnosis of pregnancy was by ultrasonography at 30 days postinooovulation. Of the recipient cows evaluated 46 had corpus luteum type 1, 80 type 2, 114 type 3 and 20 type included, resulting in 16 (34.78%), 29 (36.25%), 41 (35.96%) and 7 (35.00%) pregnant females, respectively. Total pregnancy indice was 35.77%. Results indicate no relationship between morphology of corpus luteum of recipient cowç ovaries of IVP embryos and pregnancy indices.

**Key-words:** ovarian, rectal palpation, production *in vitro*, zebu

### **3.1 Introdução**

Em um sistema de produção de bovinos de corte, a eficiência reprodutiva é o aspecto mais importante da atividade, por estar diretamente relacionada ao aumento na taxa de desfrute do rebanho. Muitos pecuaristas têm significativas perdas

econômicas quando suas matrizes não produzem um bezerro por ano, consequência de períodos de anestro pós-parto prolongado (FERRAZ et al., 2008).

Os programas de produção *in vitro* (PIV) estabelecem um acelerado progresso genético através da multiplicação de animais geneticamente superiores. Porém, como qualquer outra ferramenta aplicada à pecuária, a PIV apresenta vantagens e também algumas restrições a sua utilização. Além dos aspectos inerentes ao embrião, a doadora e ao ambiente, as variáveis relacionadas à receptora também são de decisiva importância na taxa de gestação das mesmas. As receptoras sincronizadas devem ser avaliadas por palpação retal ou por ultrassonografia, antes da inovulação para avaliação morfológica do corpo lúteo e confirmação da ovulação anterior (ALVES et al., 2008).

A formação do corpo lúteo (CL) inicia-se por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas nas células da teca e da granulosa do folículo pré-ovulatório, fenômeno que ocorre devido à elevação do hormônio luteinizante (LH). A progesterona ( $P_4$ ) produzida pelo CL exerce diversos efeitos biológicos em tecidos alvos do organismo. Existem associações entre embriões considerados pequenos e baixas concentrações circulantes de  $P_4$  e vacas gestantes apresentando concentrações séricas de  $P_4$  acima de 4,0 ng/mL. Embora seja esperado que o tamanho do CL influencie a secreção de  $P_4$ , são poucos os experimentos com uma avaliação crítica dessa possível relação (VIEIRA et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre o tamanho do corpo lúteo, palpado por via retal, no dia da inovulação, e os índices de prenhez.

### **3.2 Materiais e Métodos**

Foram avaliadas, como receptoras, 260 vacas mestiças, cíclicas e com escore corporal 2 e 3 (numa escala de 0 a 5, onde zero são vacas muito magras e 5 vacas muito gordas), com idade entre 18 e 24 meses, clinicamente sadias, inovuladas com embriões produzidos *in vitro* da raça Nelore, realizadas no período de julho a novembro de 2008, em propriedades particulares localizadas nos municípios de Colinas e Piraquê, no Estado do Tocantins e na cidade de

Paragominas, no Estado do Pará. Todas as fêmeas eram manejadas predominantemente em pastagens de *Brachiaria brizantha* e recebiam suplementação mineral à vontade.

As receptoras foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização de estro em momento aleatório do ciclo estral. Um grupo, G1, composto de 110 fêmeas que receberam 2,0mL de d-cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil), via IM, em única dose. O outro grupo, G2 com 150 fêmeas, recebeu implante auricular de norgestomet (Crestar<sup>®</sup>, Intervet, Brasil) e 2,0mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil), via intramuscular. No quinto dia as fêmeas receberam, via IM, 200UI de gonadotrofina sérica eqüina (Folligon<sup>®</sup>, Intervet, Brasil) e 150 µg de d-cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Brasil). No oitavo dia retirou-se o implante e 24 horas depois todos os animais receberam via IM 1,0mg de benzoato de estradiol.

No dia da inovulação dos embriões, o Médico Veterinário responsável pelo Laboratório, avaliou os ovários das receptoras por palpação retal, para identificar, localizar e classificar o CL quanto aos tipos pequeno (1 = 0,5 cm), médio (2 = 1,0cm), grande (3 = 2,0cm) e incluso (IN = sem assimetria).

Todos os embriões, provenientes de produção *in vitro* (PIV), no Dia 7, foram transferidos pelo método não cirúrgico, no corno ipsilateral ao ovário que continha o CL.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia transretal, 30 dias após a inovulação utilizando um aparelho Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear de 5,0 MHz de frequência.

Os índices de prenhez obtidos foram analisados de acordo com o teste estatístico não paramétrico do qui-quadrado ( $X^2$ ), com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ), utilizando-se Proc Freq do programa Statistical Analysis System (SAS, 2002).

### **3.3 Resultados e Discussão**

O tipo de corpo lúteo e índice de prenhez das receptoras, apresentados na Tabela 1, não apresentaram relação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 1** - Índices de prenhez em receptoras de embrião e a sua relação com os tipos do corpo lúteo (CL), municípios de Colinas, Piraquê (TO) e Paragominas (PA), 2008.

<b>Tipo do Corpo Lúteo (CL)</b>	<b>Número de Receptoras Inovuladas</b>	<b>Número de Receptoras Prenhes</b>	<b>Índice de Prenhez (%)</b>
CL1	46	16/46	34,78
CL2	80	29/80	36,25
CL3	114	41/114	35,96
CL IN	20	7/20	35,00
<b>Total</b>	<b>260</b>	<b>93/260</b>	<b>35,77</b>

$\chi^2 = 0.0346$ ;  $P > 0,05$

Esses dados corroboram com os trabalhos de Ramsey e Roussel (1982), Basile e Chebel (1989), Dochi et al. (1998) e Vieira et al. (2002) no que se refere aos tipos de corpos lúteos e percentual de índices de prenhez.

Vieira et al. (2002), obtiveram índices de prenhez superiores ao deste trabalho, 58,4% (CL1 - pequeno), 59,4% (CL2 - médio) e 59,3 (CL3 - grande), no entanto não apresentou diferenças nestes índices entre os tipos de corpos lúteos.

Alves et al. (2008), verificaram que existe uma dependência entre as variáveis de classificação de CL em função da assimetria ovariana por palpação retal, com índices de prenhez de 34,31% para CL1, 30,72% para CL2 e 21,40% para CL3. Esses diferentes resultados podem ser explicados pelo fato de que a palpação retal apresenta limitações devido a sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989) e por ser insatisfatória para avaliar CL pequenos, apesar de eficiente para avaliar CL médios e grandes (LEAL, 2004).

Quando a ultra-sonografia é utilizada como método para mensuração de CL, pode-se notar a completa visualização do tecido luteal, o que possibilita uma melhor precisão na identificação e mensuração do CL (PIERSON e GINTHER, 1987; HANZEN et al. 2002).

Os tipos de corpos lúteos encontrados não apresentaram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) para os dois protocolos usados (Tabela 2), significando que o tratamento hormonal não influencia na formação do corpo lúteo, ou seja na luteinização das células foliculares, granulosa e teca interna e externa antes da formação das células luteais grandes e pequenas. No entanto os protocolos

influenciaram nos índices de prenhez, observando maior índice quando usado o tratamento com a prostaglandina do tipo F2 (d-cloprostenol) (Tabela 3).

**Tabela 2** - Percentual (%) dos tipos de corpos lúteos de acordo com protocolo usado em receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro*, Municípios de Colinas, Piraquê (TO) e Paragominas (PA), 2008.

<b>Classificação do Corpo Lúteo (CL)</b>	<b>Protocolo Crestar (%)</b>	<b>Protocolo Prostaglandina (%)</b>
CL1	65,22	34,78
CL2	60,00	40,00
CL3	54,39	45,61
CL IN	50,00	50,00
<b>Total</b>	<b>57,69</b>	<b>42,31</b>

$\chi^2 = 0,0346$ ;  $P > 0,05$

**Tabela 3** - Percentual (%) de receptoras de embriões produzidos *in vitro*, prenhes e vazias, após sincronização com prostaglandina e Crestar, Municípios de Colinas, Piraquê (TO) e Paragominas (PA), 2008.

<b>Protocolo</b>	<b>Prenhe (%)</b>	<b>Vazia (%)</b>
Prostaglandina	42,2	57,80
Crestar	29,8	70,20
<b>Total</b>	<b>35,0</b>	<b>65,0</b>

$\chi^2 = 4,31$   $P < 0,05$

Nos programas de transferência de embriões, segundo Binelli (2001), a formação de corpos lúteos maiores em receptoras pode aumentar as taxas de prenhez. Sá Filho et al., (2004) também verificaram que o tratamento com eCG na retirada do implante auricular de progestágeno aumentou o diâmetro máximo do folículo dominante, podendo formar corpos lúteos maiores, o que corrobora com os achados de Bó et al. (2002).

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que não existe relação entre o CL, avaliado durante a palpação retal, no dia da inovulação, e os índices de prenhez em receptoras de embriões de PIV.

## REFERÊNCIAS

ALVES, B. G.; NEVES, S. M. N.; ARRUDA, R. P.; NAVES, J. H. F. E.; ALVES, K. A. A classificação do corpo lúteo por assimetria ovariana e sua relação com os índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. In: XXXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária . CONBRAVET. **Anais...**, Gramados, RS, 2008

BASILE, J. R.; CHEBEL, R. J. Efeito do embrião e do corpo lúteo da receptora no índice de prenhez na raça holandesa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., **Anais...**, Belo Horizonte, 1998,

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.56, n.9, p.1451-1463, 2001.

BÓ, G. A. et al. The control follicular wave development for selpointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

DOCHI, O.; YAMAMOTO, Y.; SAGA, H. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol. **Theriogenology**, New York, v. 49, p. 1051-1058.

FERRAZ, H. T., VIU, M. A. O., LOPES, D. T., OLVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **PUBVET**, v.2, n.12, 2008.

HANZEN, C., PIETERSE, M., SCENCZI, O., DROST, M.. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation *per rectum*. **The Veterinary Journal**, v. 159, n2. p.161-170, 2002.

LEAL, L. S. 2004. **Avaliações Ovarianas, níveis hormonais e aspectos quantitativos e qualitativos da transferência de embriões em bovinos.** 82 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) . Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2004.

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

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

SÁ FILHO, M. F. et al. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactentes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GNRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 235, 2004.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide.** Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

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

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

### CAPÍTULO III

#### INFLUÊNCIA DO MOMENTO DA INOVULAÇÃO EM ÍNDICES DE PRENHEZ EM RECEPTORAS BOVINAS INOVULADAS COM EMBRIÕES DE PIV DA RAÇA.

##### RESUMO

A Produção *in vitro* de embriões bovinos é uma biotécnica que vem se desenvolvendo rapidamente e com ela surgem novas perspectivas na reprodução e no melhoramento animal. Porém, um dos principais pontos na difusão dessa tecnologia diz respeito à taxa de prenhez das receptoras. Após a inovulação as taxas de prenhez são baixas, tornando a técnica cara e influenciando negativamente o produtor a decidir por essa técnica. Objetivou-se verificar a relação entre o dia da fertilização *in vitro* e o dia do estro da receptora com os índices de prenhez. Foram selecionadas 260 receptoras bovinas mestiças no período de julho a novembro de 2008, sincronizadas com dois diferentes protocolos. As receptoras entraram em estro um dia antes, um dia após e no dia da fertilização *in vitro*. Os embriões foram inovulados no sétimo dia após a fertilização por via transcervical, no corno ipsilateral ao ovário que continha corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi através de ultrassonografia aos 30 dias pós-inovulação. Dentre as receptoras inovuladas, 40 tiveram o estro observado um dia antes da fertilização *in vitro* (D-1), 137 no dia da FIV (D0) e 83 um dia após (D+1), resultando em uma taxa total de prenhez de 38,8%, sendo que para cada dia específico a taxa de prenhez resultante foi de 42,5 % para D -1; 41,61% para D0 e 30, 12 % para D +1. Esses resultados sugerem não haver relação entre o dia do estro da receptora inovulada e o dia da fertilização *in vitro* com as taxas de prenhez.

**Palavras-chave:** fertilização *in vitro*, transferência de embriões, zebuínos, hormônios.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF TIME OF INOVULAÇÃO RATES IN PREGNANCY IN RECIPIENTS OF BOVINE EMBRYOS INOVULADAS WITH PIV OF NELLORE

The *in vitro* production embryos bovine is a biotechnology that has been developing rapidly and with it come new perspectives on reproduction and animal breeding. One of main points in dissemination this technology relates to pregnancy indices in recipient cows. After inovulações the pregnancy indices are low, making expensive technique as well as negatively influencing producer to decide by technique. The aim was investigating relationship between the day of *in vitro* fertilization and the day of estrus of recipient cows with the pregnancy indices. 260 crossbred recipient cows were selected in the period July to November of 2008, synchronized with two different protocols. Recipient cows presented estrus one day before, one after and at day of *in vitro* fertilization. Embryos were inovulated on seventh day after fertilization by transcervical in horn ipsilateral to ovary containing corpus luteum. The diagnosis of pregnancy was by ultrasonography at 30 days postinovation. Of the recipient cows inovulated, 40 had estrus one day before of the *in vitro* fertilization (D-1), 137 on the day IVF (D0) and 83 one day after (D +1), resulting in an overall pregnancy indices of 38.8% and for each day the pregnancy indices obtained was 42.5% (D-1); 41.61% (D0) and 30.12% (D+1). Results indicate no relationship between the day of estrus of recipient cows inovulada and the day *in vitro* fertilization with pregnancy indices.

**Key-words:** embryo transfer, hormones, *in vitro* fertilization, Zebu

## 2.1 Introdução

A Produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica da reprodução que tem um grande potencial para acelerar o melhoramento genético de um rebanho bovino (GALLI et al., 2000), que visa a obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo da fêmea (HAFEZ & HAFEZ, 2004) e pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes e com problemas de infertilidade adquiridos (TERVIT, 1996; GOODHAND et al., 1999; MALARD et al., 1999; TANEJA et al., 2000).

Além dos aspectos inerentes ao embrião, à mãe e ao ambiente, as variáveis relacionadas ao método de inovulação também são de decisiva importância na taxa de gestação das receptoras (SREENAN & DISKIN, 1987). Após a transferência de embriões classificados como morfológicamente viáveis, a taxa de gestação situa-se em torno dos 55% (FERNANDES, 1999), o que representa uma elevação substancial no custo de cada produto, influenciando negativamente o produtor no momento de decidir em adotar essa técnica.

Tendo em vista que com a transferência de embriões de produção *in vitro* é possível se alcançar uma taxa de prenhez de 50%, pode-se obter entre 25 a 50 terneiros/vaca/ano, o que supera a eficiência da metodologia convencional de transferência de embriões, com custos inferiores. Considerando-se ser possível usar, com êxito, animais que não respondem a tratamentos superovulatórios, sua eficiência tem uma importância (PALMA et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre o dia da fertilização *in vitro* e o momento do cio de receptoras com os índices de prenhez.

## 2.2 Materiais e Métodos

Foram avaliadas, como receptoras, 260 vacas mestiças, cíclicas e com escore corporal 2 e 3 (numa escala de 0 a 5, onde zero são vacas muito magras e 5 vacas muito gordas), com idade entre 18 e 24 meses, clinicamente sadias, inovuladas com embriões produzidos *in vitro* da raça Nelore, realizadas no período de julho a novembro de 2008, em propriedades particulares localizadas nos municípios de Colinas e Piraquê, no Estado do Tocantins e na cidade de Paragominas, no Estado do Pará. Todas as fêmeas eram manejadas predominantemente em pastagens de *Brachiaria brizantha* e recebiam suplementação mineral à vontade.

As receptoras foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização de estro em momento aleatório do ciclo estral. Um grupo, G1, composto de 110 fêmeas que receberam 2,0mL de d-cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil), via IM, em única dose. O outro grupo, G2 com 150 fêmeas, recebeu implante

auricular de norgestomet (Crestar<sup>®</sup>, Intervet, Brasil) e 2,0mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil), via intramuscular. No quinto dia as fêmeas receberam, via IM, 200UI de gonadotrofina sérica eqüina (Folligon<sup>®</sup>, Intervet, Brasil) e 150 µg de d-cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Brasil). No oitavo dia retirou-se o implante e 24 horas depois todos os animais receberam via IM 1,0mg de benzoato de estradiol.

Foi utilizado sêmen congelado de touros da raça Nelore, provenientes de central, devidamente testados.

Os oócitos utilizados para a PIV foram obtidos de vacas da raça Nelore. Foram aspirados através do método de OPU, lavados em meio DMPBS e selecionados. Após seleção foram colocados em criotubos contendo meio de MIV adicionados de uma mistura gasosa contendo CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> e então colocados no transportador de oócitos (Mini Tub) numa temperatura de 38,05 °C e encaminhados ao Laboratório Brio Genética localizado em Araguaína, no Estado do Tocantins.

No Laboratório, os oócitos foram transferidos à uma placa de Petri de 35 mm, contendo meio de maturação TCM 199 e distribuídos em número máximo de 25 oócitos por microgota, identificados e colocados numa estufa úmida a 8,5°C por 24 horas em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

Na fecundação *in vitro*, a fração móvel do sêmen foi separada pelo gradiente de Percoll (45 e 90%) e, a seguir, os espermatozoides foram transferidos para as gotas de fecundação com concentração espermática de 5x10<sup>3</sup> espermatozoide por oócito. Após uma hora, adicionou-se os oócitos na gota, permanecendo em cultivo com os espermatozoides por 22h, seguindo para o cultivo *in vitro* em meio meio SOF.

No sétimo dia após a FIV, foi avaliada a taxa de formação de blastocistos e a qualidade destes embriões PIV. Os embriões foram lavados duas vezes em meio H-SOF e envazados em palheta francesa fina (0,25 mL) com meio H-SOF, devidamente identificados em M, Bi, Bl e Bx. As palhetas foram identificadas para evitar equívocos no momento da inovulação. A inovulação dos embriões nas vacas receptoras foi realizada nas mesmas que apresentaram cio no dia da FIV (dia 0), um dia antes da FIV (D -1), usando embriões mais adiantados, Bl (blastocisto) ou Bx (blastocisto expandido) e no dia posterior à FIV (D +1), usando embriões mais atrasados, M (mórula) ou Bi (blastocisto inicial).

## 2.3 Resultados e Discussão

Os resultados encontrados sugerem não haver relação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) na sincronização entre o dia da FIV e o dia do estro da receptora (Tabela 1). Podendo assim, o embrião ser transferido em qualquer um dos dias mencionados, desde que estabelecido um critério para a inovulação de embriões, em que as receptoras que entraram em estro um dia antes da FIV (D -1) recebam embriões mais adiantados (BI ou Bx) e as receptoras que entraram em estro um dia posterior à FIV (D +1) recebam embriões mais atrasados (M ou Bi).

**Tabela 1** - Percentual de receptoras de embriões produzidos *in vitro* prenhes e vazias que foram inovuladas com embriões de PIV e apresentaram estro um dia antes da fertilização (D-1), no dia (DO) e um dia após a fertilização *in vitro*, Municípios de Colinas, Piraquê (TO) e Paragominas (PA), 2008.

Dia do cio	Prenhe (%)	Vazia (%)
-1	42,50	57,50
0	41,61	58,39
1	30,12	69,88
<b>Total</b>	<b>38,08</b>	<b>61,92</b>

$\chi^2 = 3,29$   $P > 0,05$

A genótipo a receptora pode influenciar as taxas de prenhez. Em raças européias, o uso de vacas e novilhas de corte e novilhas leiteiras resultam em taxas de prenhez semelhantes, enquanto que vacas leiteiras (em produção) apresentam uma taxa de prenhez consideravelmente menor. Em raças zebuínas, parece não haver diferença na taxa de prenhez quando se utilizam receptoras (ALVAREZ, 2008). Semelhante aos resultados deste trabalho, onde se observou não haver diferenças nos índices de prenhez das receptoras mestiças.

Os índices de prenhez foram aproximadamente entre 30 a 42% diagnosticados aos 30 dias pós inovulação. Outros autores relatam que as taxas de gestação obtidas a partir de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está associada à qualidade do embrião, o que, por sua vez, depende das condições de produção de cada laboratório. Além disso, como na transferência de embriões, o estado reprodutivo e nutricional das receptoras também interfere nos resultados. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado entre 20 e

60% de acordo com cada equipe de trabalho (GARCIA et al., 2005; VARAGO et al., 2008).

Estes índices de gestação obtidos estão diretamente relacionados com as condições sanitárias, reprodutivas e de sincronização das receptoras. As receptoras contribuem com mais de 70% do êxito nas porcentagens de prenhez, sendo que 30% então relacionados com a qualidade embrionária (EMBRIOTECH, 2008).

No que se refere aos programas de transferência de embriões, assumindo-se uma boa competência do técnico que executa a TE, os principais fatores que afetam a taxa de prenhez são a qualidade do embrião e da receptora. Em muitas operações comerciais, a taxa de sucesso com TE freqüentemente excede 70%. Porém, o planejamento de um programa de TE deve considerar números mais modestos (da ordem de 50%), mesmo quando em determinadas ocasiões sejam alcançadas taxas de prenhez da ordem de 80% após a transferência de embriões frescos de boa qualidade em receptoras idôneas (HASLER, 2003).

Há muito tempo é conhecido que o grau de sincronização do cio entre o embrião e a receptora influencia a taxa de prenhez. Vários estudos parecem indicar que a sincronia é mais crítica em receptoras de corte que de leite. Entretanto, num estudo com programas de TE, comparando receptoras de corte e leiteiras, não houve diferença nas exigências de sincronia, fator determinante no sucesso desta biotecnologia (HASLER, 2001).

Contudo, embriões produzidos *in vitro* e embriões produzidos *in vivo* possuem diferenças no que diz respeito à qualidade, visto que os segundos são produzidos no interior da fêmea, seu ambiente de desenvolvimento natural.

## **CONCLUSÕES**

Não houve influência do dia do estro relacionado com o dia da fertilização *in vitro* nos índices gestacionais das receptoras de embriões de produção *in vitro*, para isso, deve-se levar em consideração o critério adotado de inovular os embriões nas vacas receptoras que apresentaram estro, um dia antes da FIV (D -1), usando embriões mais adiantados, como blastocisto ou blastocisto expandido e no dia posterior à FIV (D +1), usando embriões mais atrasados, como mórula ou blastocisto

inicial. São necessários mais estudos voltados para as receptoras, visto que elas assumem papel importante no sucesso da PIV.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, R. H. **Fatores determinantes do sucesso de um programa de transferência de embriões em bovinos**. 2008, Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://infobibos.com/artigos/2008\\_1/embriões/index.htm](http://infobibos.com/artigos/2008_1/embriões/index.htm)> acesso em: 01/02/2009.

EMBRIOTECH, **¿Qué es la fertilización *in vitro*?** Información Técnica. EMBRIOTECH [http://www.embryotechcr.com/embryotech/index.php?option=com\\_content&task=view&id=104&Itemid=73](http://www.embryotechcr.com/embryotech/index.php?option=com_content&task=view&id=104&Itemid=73) , acesso em 04/02/2009.

FERNANDES, C. A. C. Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação em receptoras de embrião. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.51 no.3 Belo Horizonte June 1999.

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

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

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

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed. Barueri: Editora Manole, 513p, 2004.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v.56, n.9, p.1401-1415, 2001.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.79, n3, p.245-264, 2003

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

PALMA, G.A.; ALLER, J.; ALBERIO, R. **Aplicación de la producción in vitro de embriones en producción lechera**. In: ENCONTRO SUL AMERICANO DE PECUÁRIA DE LEITE, 1., Pelotas, dezembro, 1998.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

SREENAN, J.M., DISKIN, M.G. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v.27, p.99-113, 1987

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Bio. Reprod.**, Champaign, v.62, p.206-213, 2000.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.227-238, 1996.

VARAGO, F.C., MENDONÇA, L. F., LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anima**, Belo Horizonte, v. 32. n.2, p. 100-109, abr./jun.2008.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)