

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRANSPORTE E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS POR 24, 48 E 72 HORAS
ANTES DA TRANSFERÊNCIA

Juliana Roland Teixeira

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRANSPORTE E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS POR 24, 48 E 72 HORAS
ANTES DA TRANSFERÊNCIA

Juliana Roland Teixeira

Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária – UFU,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias (Produção
Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T266t
2013 Teixeira, Juliana Roland, 1986-
 Transporte e cultivo de embriões bovinos por 24, 48 e 72 horas antes
da transferência / Juliana Roland Teixeira. - 2013.
 52 f. : il.

 Orientador: José Octávio Jacomini.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Teses. 3. Incubadoras - Teses. 4.
Sêmen - Transporte - Teses. I. Jacomini, José Octávio. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, que esteve muito mais que presente em minha vida nesses últimos anos, sem Ele nada disso seria possível as forças não suportariam!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado à oportunidade de realizar mais essa conquista em minha vida, por ter me dado sabedoria e força para suportar os momentos difíceis, por operar milagres em minha vida e na vida da minha família, por ter me carregado nos momentos difíceis e estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço ao meu pai Hugo Tormin Teixeira, que se mostrou muito mais que meu herói, mas um guerreiro, na batalha que a vida lhe fez lutar, que me deu carinho e forças no momento em que era ele quem precisava. Que me ensina todos os dias que a superação dos problemas é uma escolha, podemos escolher nos render a ele ou lutar contra ele. Pai é por você, pra você! Amo demais!

Agradeço a minha mãe, Olivia Aparecida Roland, minha amiga... pelas noites em claro, pelas orações, pelos conselhos, pelos colos, pelos ensinamentos e convicções, pelas lágrimas derramadas... Exemplo de garra, força, determinação, alegria... você faz os meus dias muito mais coloridos. Amo você!

Agradeço as minhas irmãs, Renata Roland Teixeira, amiga, protetora.... pelos ensinamentos, pelo exemplo, pela ajuda, pela compreensão da ausência, por tudo que me representa! Amo você! E Michelle Tormin Zacharias, raspinho de tacho... que alegra meus dias e me mostra a pureza da inocência.

Agradeço as minhas tias e tios que sempre torceram por mim, por meus sonhos e meu sucesso... Vocês são muito especiais pra mim!

Agradeço ao meu noivo, Luis Gustavo Antunes Souza, pelo carinho, atenção, por acreditar na minha capacidade e me dar forças nos meus momentos de fraqueza, por dividir comigo o mesmo objetivo e lutar junto comigo para alcançar nossos sonhos. Amo você!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Octávio Jacomini, que forneceu orientações, conselhos profissionais, conselhos pessoais durante todos esses anos. Que foi muito mais que compreensivo, foi um verdadeiro amigo. Obrigada!!!

Agradeço ao médico veterinário, Wellington Pereira de Lima, que foi peça importante para realização desse projeto. Obrigada pelo apoio, pela ajuda, pelos ensinamentos. Aprendi muito durante todos esses anos. Obrigada! A Equipe DEP – Assessoria Reprodutiva e a Equipe Vitrogen em especial o médico veterinário Diogo Ardaís, que também fizeram parte da realização desse projeto. Sem todos vocês esse projeto não seria possível. Obrigada!

As fazendas Douradinho em Uberlândia – Minas Gerais e Paraíso em São José do Xingu – Mato Grosso, pela disponibilidade dos funcionários, animais, dados e planejamento para realização do projeto.

Aos amigos, colegas, companheiros de trabalho, vaqueiros que direta e indiretamente colaboraram para realização desse projeto.

OBRIGADA A TODOS!!!

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	04
A raça	04
Produção <i>in vitro</i> de embriões	05
Maturação <i>in vitro</i>	07
Fertilização <i>in vitro</i>	07
Cultivo <i>in vitro</i>	08
Sêmen sexado na FIVE	09
Tempo e condições de transportes de ovócitos e embriões	10
Sincronia receptora – embrião	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
Local	14
Animais	14
Aspiração folicular	15
Produção <i>in vitro</i>	16
Envase dos embriões à distância	17
Protocolo de TETF	17
Transferência dos embriões	18
Análises estatísticas	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	26
REFERENCIAS	27

RESUMO

Avaliou-se a viabilidade do transporte e cultivo em incubadoras portáteis de embriões produzidos *in vitro*, por 24, 48 e 72 horas por meio das taxas de produção de blastocistos e de concepção dos respectivos embriões. Na produção de embriões *in vitro* obteve-se taxa de blastocisto de 18,19%, 22,28% e 22,72% nos transportes-cultivo por 24, 48 e 72 horas, respectivamente, com diferença estatística para o transporte-cultivo por 24 horas. Os resultados de taxa de concepção aos 30 e 60 dias foram semelhantes em todos os dias de transporte e cultivo dos embriões, obtendo-se taxas de 44,51%, 42,82% e 44,66% aos 30 dias pós TE, nas 24, 48 e 72 horas de transporte e cultivo, respectivamente, e 41,12%, 40,99% e 42,42% aos 60 dias pós TE, nas 24, 48 e 72 horas de transporte e cultivo, respectivamente, não diferindo entre os grupos. O transporte e cultivo de embriões por 24, 48 ou 72 horas antes da transferência, em incubadoras portáteis, mostraram-se viáveis, quanto às taxas de concepção, entretanto a taxa de produção de blastocisto foi menor quando o transporte e cultivo ocorreram por 24 horas.

Palavras chave: Aspiração, Gir, Incubadora Portátil, Sêmen sexado.

ABSTRACT

It was evaluated the feasibility of the transport and cultivation in portable incubator of embryos produced in vitro by 24, 48 and 72 hours by assessing blastocyst rates and conception of the respective embryos. In vitro production of embryos obtained blastocyst rate of 18.19%, 22.28% and 22.72% in transport-cultivation for 24, 48 and 72 hours, respectively, with statistical difference for transport-cultivation by 24 hours. The results of conception rate after 30 and 60 days was similar on all days of cultivation and transportation of embryos, yielding rate 44.51%, 42.82% and 44.66% at 30 days post ET in 24, 48 and 72 hours of transportation and cultivation, respectively, and 41.12%, 40.99% and 42.42% at 60 days post ET in 24, 48 and 72 hours of transportation and cultivation, respectively. The transport and cultivation of embryos for 24, 48 or 72 hours before the transfer in portable incubators, were viable, regarding the conception rate, however the rate of blastocyst production was lower when transport and cultivation occurred for 24 hours.

Keywords: Ovum pick up, Gir, Portable Incubator, sexed semen.

INTRODUÇÃO

Dentre os avanços científicos e tecnológicos no contexto da produtividade na pecuária, várias biotécnicas aplicadas ao melhoramento genético bovino vêm sendo aprimoradas. Tais biotécnicas, como inseminação artificial, transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, tem como objetivo aumentar o número de descendentes de um animal de alto valor genético e interesse econômico (SAMPAIO; SANTOS, 2006), melhorar a eficiência reprodutiva dos bovinos, aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2001; RENESTO, 2004; VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008).

A biotécnica que se destaca é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo a terceira geração de biotécnicas utilizada atualmente em larga escala (TESSMANN et al., 2004; VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008). A PIVE consiste na manipulação dos gametas, onde os processos fisiológicos que acontecem naturalmente na fêmea, são reproduzidos em condições laboratoriais (GALLI et al., 2001).

A utilização da PIVE em larga escala nos rebanhos comerciais é restrita devido ao alto custo operacional, ao tempo requerido na rotina de produção e à variação dos resultados obtidos pelos laboratórios. Além disso, o monitoramento das doadoras, das receptoras e dos embriões deve ser rigoroso para garantir a eficiência da técnica (MARINHO et al., 2012).

O sucesso da PIVE está associado a diversos fatores, como: genética, raça, idade dos animais (ROCHA et al., 1998), estação do ano (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002), origem e qualidade dos ovócitos (RIZOS et al., 2002), condições de cultivo dos ovócitos e experiência do técnico (WATSON et al., 2000; LONERGAN; RIZOS; KANKA, 2003).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de propiciar condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* mais adequado (PONTES et al., 2010; BARUSELLI et al., 2012; MARINHO et al., 2012). Os métodos de transporte, de ovócitos e embriões, utilizados pelos laboratórios vão desde criotubos a tubos de ensaio em estufas portáteis (KAISER et al., 1999). O pH dos meios é controlado pelo sistema bicarbonato/CO₂ (GORDON, 1994). O transporte dos ovócitos também pode ser feito em meios que contenham tampão orgânico (Hepes), que não necessita do controle da atmosfera, mas apenas do monitoramento da temperatura (SHI;

AVERY; GREVE, 1998) e do tempo de transporte (WARD; ENRIGHT; BOLAND, 2000).

O domínio da PIVE colocou o Brasil em uma posição de destaque no segmento, despertando o interesse de outros países não só pelas biotécnicas envolvidas, mas também pelo fato do país possuir o maior rebanho do mundo e ser o principal exportador de carne bovina (O EMBRIÃO, 2013).

De acordo com a tendência de mercado algumas raças estão se destacando dentro da produção *in vitro* (THIBIER, 2006). Sem mencionarmos a raça Nelore, que obtém o maior número de embriões produzidos, a raça Gir vem ganhando mercado na produção de embriões e foi a única que manteve registros de crescimento ano após ano, ganhando espaço no total de embriões produzidos (RODRIGUES et al., 2010a). Essa tendência é um direcionamento ou sequência de eventos, com certa força ou durabilidade (KOTLER, 2006), se fizermos uma análise mais profunda, observaremos que houve um aumento no consumo de produtos lácteos no Brasil e no mundo (VILA, 2010), o que impulsionou ainda mais a busca por uma produção barata, porém de qualidade.

Cada vez mais o produtor terá que se adequar sanitariamente para atender legislações e mercados exigentes, preparando-se ainda mais para o mercado internacional (VILA, 2010). O aumento na produção de embriões ainda é conservador, pois temos de levar em consideração que a produção de embriões não está diretamente ligada ao oferecimento do produto final ao consumidor e sim é apenas a primeira etapa do processo de produção (RODRIGUES et al., 2010a). Porém, existe uma tendência de aumento desta produção, atrelada obviamente à demanda e aos mercados – interno e externo – que pode fazer com que a produção de embriões aumente ainda mais nos próximos anos (VILA, 2010; RODRIGUES et al, 2010).

No Brasil, em função da grande extensão territorial, principalmente das regiões Norte e Centro Oeste, consideradas as regiões de maior extensão territorial do país, (IBGE, 2012) as condições de transporte dos ovócitos até o laboratório de PIVE quanto o transporte dos embriões do laboratório de PIVE até as fazendas, são consideradas como fatores limitantes à produção comercial, pois, em muitos casos, o transporte pode demorar várias horas ou até dias (LEIVAS et al., 2001).

Analisando a distribuição do rebanho bovino, segundo as grandes regiões do Brasil, observa-se que a região Centro Oeste se destaca, como tendo o maior rebanho bovino do país (72.662.219 de cabeças) seguida da região Norte (43.238.310 cabeças) e

região Sudeste (39.334.869 de cabeças) (IBGE, 2012). Dessa forma, torna-se importante o estudo de novos métodos de transporte tanto dos ovócitos quanto dos embriões, para utilização de novas biotécnicas reprodutivas nas regiões do país onde se encontra a maior concentração do rebanho bovino brasileiro.

Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade do transporte e cultivo em incubadoras portáteis de embriões produzidos *in vitro*, por 24, 48 e 72 horas, por meio da análise das taxas de produção de blastocistos e de concepção resultantes da transferência dos respectivos embriões.

REVISÃO DE LITERATURA

As biotécnicas associadas à reprodução tem apresentado crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto nos aspectos básicos quanto nos aspectos aplicados (BARUSELLI et al., 2012; MAREI; GHAFARI; FOULADI-NASHTD, 2012; GAO et al., 2013). A busca pelo maior aproveitamento dos gametas femininos faz com que as pesquisas no âmbito das biotécnicas reprodutivas procurem desenvolver sistemas cada vez mais eficientes visando maior produção de embriões viáveis (PONTES et al., 2010; BARUSELLI et al., 2012; RASMUSSEN et al., 2013).

A PIVE é hoje uma técnica de uso rotineiro no Brasil. No entanto, as taxas de produção de blastocistos provenientes de ovócitos fertilizados *in vitro* são bastante variáveis (0 a 50%) (NAGAO; IJIMA; SAEKI, 2008; SARENTONGLAGA et al., 2012). Muitos fatores afetam a qualidade dos ovócitos: fase do ciclo estral, fase do crescimento folicular, estado das células do *cumulus* (HAGEMANN et al., 1999; WIT; WURTH; KRUIP, 2000; THOMPSON; LANE; GILCHRIST, 2007) e a saúde das doadoras (SARENTONGLAGA et al., 2012).

A raça

A cadeia produtiva do leite no Brasil vem enfrentando mudanças significativas nos últimos anos. Dessa forma, a profissionalização passa a ser vital no sistema de produção, bem como a eficiência da empresa rural. Os avanços tecnológicos na bovinocultura leiteira tem recebido crescente atenção por parte dos vários segmentos do setor lácteo. Alguns dos aspectos e etapas que podem evoluir estão correlacionados ao tipo do rebanho explorado, à reprodução, à sanidade do rebanho e à nutrição (NANZER, 2010).

A raça girolando é usada em sistemas de produção de leite a pasto no Brasil, unindo a alta produção da raça Holandesa (*Bos taurus*) com a rusticidade e adaptação térmica da raça Gir (*Bos taurus indicus*). Dentre as diversas características do gado girolando pode-se destacar a produtividade, a rusticidade, a precocidade, a longevidade e a fertilidade (ABCG, 2014).

Destaca-se a importância da raça na pecuária leiteira, sendo responsável por aproximadamente 80% do leite produzido no Brasil, graças a sua alta capacidade de

adaptação a diferentes tipos de manejo e clima, podemos encontrar animais girolando de norte a sul, sem comprometer sua produção (ABCG, 2014).

A raça Gir exerce destacado papel neste contexto por ser uma raça que incorpora rusticidade, produtividade e docilidade, sendo ainda eficiente na produção de leite a baixo custo, principalmente quando utilizada em cruzamentos com animais de raças especializadas para a produção leiteira, sendo por isso uma das principais raças zebuínas utilizadas para esse fim (GOMES, 2006).

Diversas raças têm sido utilizadas para PIVE. Embora seja descrito que a fertilidade entre raças bovinas pode variar, poucos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar as variações entre as raças, sendo difícil a comparação pela diversidade de métodos utilizados (SENEDA et al., 2002).

Animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral, apresentam maior número de folículos nos ovários, em comparação com vacas de raças européias, com médias variando entre 18 e 25 ovócitos recuperados por sessão de OPU (WATANABE et al., 1999).

A fertilidade entre as raças na produção *in vitro* de embriões bovinos pode variar. Abraham et al. (2010) objetivaram determinar a influência da raça da doadora de ovócitos sobre o desenvolvimento de embriões após a MIV, FIV e CIV. Os autores compararam animais das raças sueco bermelho e branca (SRB), sueco holandesa (SLB) e raças de corte mestiças, e constataram que as taxas de clivagem e o percentual de embriões desenvolvidos, além de duas células, não diferiram entre as raças de corte mestiças e a SRB, sendo que a SLB foi significativamente maior do que as demais raças.

Segundo Ramos et al. (2006a) quando analisamos a produção *in vitro* de embriões da raça gir, que é a precursora da raça girolando observamos uma média de $10,68 \pm 6,50$ ovócitos recuperados por sessão de OPU, com um índice de 18,07% de produção de blastocistos, em doadoras gir não lactantes sem suplementação na dieta. Já segundo Ferreira (2011) que avaliou número de ovócitos viáveis aspirados e blastocistos produzidos, obteve $20,0 \pm 10,6$ e $5,70 \pm 4,9$, respectivamente em doadoras da raça gir lactantes, com suplementação na dieta. Dessa forma, podemos observar que há uma grande variação de produção dentro da raça e lactação, dieta e manejo são variáveis que influenciam na produção de ovócitos e embriões.

Produção *in vitro* de embriões

A PIVE em bovinos é mais uma alternativa a ser utilizada nos programas de reprodução, pois além de sua relevância em estudos biotecnológicos, possui fundamento comercial, e tem potencial para alcançar grandes avanços genéticos, selecionando animais geneticamente superiores (MERTON et al., 2003; PONTES, 2009; PONTES et al., 2010).

O grande benefício dessa biotecnologia é utilizar embriões de vacas de alto valor genético em receptoras comuns com o objetivo de acelerar o processo de melhoramento, gerando aumento de produtividade e lucratividade para toda a cadeia de produção de carne e de leite (O EMBRIÃO, 2013).

Estima-se que no mundo são realizadas mais que 1,1 milhões de transferências de embriões, sendo desses, 36,5% provenientes de PIVE. O Brasil é líder do mercado mundial de embriões *in vitro*, com 58,7% de participação. Em 2011 a produção de embriões bovinos no Brasil alcançou a marca histórica de 350.762, dos quais 90,7% produzidos *in vitro*, isto representa um aumento de 15,7% em relação ao total de embriões produzidos em 2010 (O EMBRIÃO, 2013).

Dos embriões produzidos *in vitro*, 93,3% foram transferidos a fresco. O número de embriões congelados mantém-se constante desde 2006 (5 a 7%). A criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, ainda não apresenta consistência de resultados que possibilite o uso comercial em larga escala. Essa limitação fica evidente quando se compara o percentual de embriões congelados produzidos *in vitro* e *in vivo*, 4,9 e 23,6%, respectivamente (O EMBRIÃO, 2013).

O crescimento dos embriões produzidos *in vitro* (PIVE) confirma que, além de substituir a transferência de embriões convencional (TE) como técnica de eleição para produção de embriões, possibilitou a expansão do mercado. Isso porque a PIVE, mais que otimizar a produção de embriões por doadora, tem efeitos positivos na escala de uso, na redução de custos e na criação de novas possibilidades de aplicação da transferência de embriões na produção animal (PONTES, 2009; O EMBRIÃO, 2013).

O processo da PIVE comercial abrange várias etapas e basicamente pode ser dividido em duas principais: a obtenção dos ovócitos, pela aspiração folicular ou ovum pick up (OPU), que é feita na fazenda e a etapa laboratorial que compreende três fases distintas, a maturação, a fecundação e o cultivo *in vitro* dos embriões. O processo de produção é conduzido em estufas com atmosfera gasosa, temperatura e umidade controlada (BUENO; BELTRAN, 2008; PONTES, 2009).

Maturação *in vitro*

Os ovócitos aspirados necessitam passar pela maturação *in vitro* (MIV) do núcleo e do citoplasma para adquirirem capacidade fecundante. No interior dos folículos ovarianos os ovócitos não encontram-se aptos a serem fecundados, sendo necessária uma série de transformações que consiste na maturação ovocitária (GALLI et al., 2003). Em condições *in vivo*, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH enquanto que no caso da aspiração folicular, este processo se inicia com a remoção do ovócito do fluido folicular (HOSHI, 2003).

No laboratório os ovócitos são transferidos para placas contendo meios de maturação onde terminam o processo de maturação em incubadora, por período entre 18 e 22 horas (TWAGIRAMUNGU et al. 1998). Esse período é necessário para que ocorra a maturação nuclear, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II (THOMPSON et al., 2000).

As modificações citoplasmáticas estão relacionadas à reorganização das organelas citoplasmáticas, migração dos grânulos corticais e às alterações significativas do padrão de síntese proteica, sendo que a transcrição de genes só voltará a ocorrer após a ativação genômica do embrião (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998).

Para que todos os eventos da maturação ovocitária ocorram *in vitro*, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD et al., 2000). Existem vários métodos diferentes que podem ser utilizados e que já foram testados durante a MIV em bovinos, sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB), gonadotrofinas (FSH, LH) e estradiol em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2000).

Sabe-se que o potencial de desenvolvimento dos ovócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂, e uso do soro e células somáticas (SANGILD et al., 2000). Após o tempo de incubação da MIV, os ovócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estando prontos para a fecundação (AVELINO et al., 2002).

Fertilização *in vitro*

Para o sucesso da fertilização *in vitro* (FIV), duas condições são essenciais: a completa maturação do ovócito e a capacitação do espermatozoide (modificações que possibilitam a penetração do espermatozoide no ovócito) (RHEINGANTZ et al., 2002).

O descongelamento da dose de sêmen ou mesmo um ejaculado, recém obtido não garante aos espermatozoides a habilidade ou capacidade de fertilizar o ovócito. No laboratório, o sêmen criopreservado ou fresco é processado de maneira que sejam obtidos apenas os espermatozoides vivos, livres de impurezas ou fatores indesejáveis, podendo ser processados pelo gradiente percoll, método mais comum (GALLI; LAZZARI, 1996) ou outros métodos como swim-up (RHEINGANTZ et al., 2002).

Em seguida, os espermatozoides são avaliados quanto a concentração e motilidade para ajuste da dose inseminante (2×10^6 espermatozoides / ml) calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva obtida após a centrifugação em gradiente percoll (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998; RHEINGANTZ et al., 2002). O período de incubação dos ovócitos com os espermatozoides varia entre 12 a 20 horas (RHEINGANTZ et al., 2002).

Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* (CIV) corresponde à etapa de desenvolvimento do ovócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocle (HOSHI, 2003).

Assim, como nas etapas anteriores, diferentes protocolos têm sido usados durante a CIV (GALLI; LAZZARI, 1996). As condições da CIV são consideradas muito importantes para que boas taxas de produção de embriões sejam alcançadas, razão pelas quais inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, podem exercer sobre o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento embrionário (FERRO et al., 2009).

O desenvolvimento embrionário é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocle, sendo que no 7º dia é feita a classificação dos embriões para a transferência a fresco ou para congelamento (THOMPSON, 2000).

Sêmen sexado na FIVE

Com o advento do sêmen sexado, o uso da biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem se consolidando como importante ferramenta para produção de animais F1, aumentando o impacto da eficiência reprodutiva de carne e leite, possibilitando o aumento dos produtos gerados a partir de matrizes puras de interesse zootécnico, além da fixação do grau de sangue desejado em (OLIVEIRA et al., 2013). Além de produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas de acordo com o objetivo do produtor, a fim de se obter vantagens das características que são limitadas ou influenciadas pelo sexo, e com isso facilitar as práticas de manejo (RATH e JOHNSON et al., 2008).

A elevada proporção de machos entre os embriões mamíferos produzidos *in vitro* pode limitar a aplicação da técnica de PIVE, sobretudo em rebanhos bovinos com aptidão leiteira, e o uso do sêmen sexado pode reverter essa situação (RHEINGANTZ et al., 2004). Essa inversão é benéfica quando as fêmeas possuem um maior valor de mercado do que os machos, como nas explorações econômicas leiteiras (RATH et al., 2009).

Porém, o procedimento de sexagem espermática afeta algumas características estruturais do espermatozoide bovino, mas não elimina sua capacidade de gerar embriões *in vitro*, apesar da sua reduzida motilidade progressiva e integridade de membrana acrossomal e mitocondrial (CARVALHO et al., 2010). Fato esse que pode explicar os menores índices de prenhez quando utilizado sêmen sexado, comparando com utilização de sêmen convencional (SÁ FILHO et al., 2011). A produção *in vitro* empregando o sêmen sexado tem sido investigada em vários estudos, e algumas diferenças tem sido atribuídas a diversos fatores (ARRUDA et al., 2011; SÁ FILHO et al., 2011).

Alguns estudos tem relatado baixas taxas de clivagem e de blastocisto (STINSHOFF et al., 2012), enquanto outros não tem observado diferenças no desenvolvimento de blastocistos entre o sêmen sexado e o não-sexado (LU e SEIDEL, 2004; CARVALHO et al., 2010). Essas diferenças podem ser devidas aos vários métodos de seleção dos ovócitos, qualidade do sêmen sexado ou tipo de cultivo (ARRUDA et al., 2011). Contudo, diferenças individuais também foram observadas, mostrando que o sêmen de alguns touros é mais negativamente afetado do que outros touros pelo processo de sexagem espermática (BLONDIN et al., 2009).

Estudos vêm sendo realizados, visando obter melhores resultados na produção de embriões *in vitro*, como a utilização de um glicosaminoglicano, a heparina, para capacitar espermatozoides bovinos (GONÇALVES et al., 2008). Palma et al. (2008), verificaram que alguns touros produziam altas porcentagens de blastocisto com somente 2µg/mL de heparina no cultivo, enquanto outros touros necessitavam de mais heparina (5-10µg/mL) para produzirem altas taxas de blastocisto, indicando que um ajuste nas concentrações de heparina para cada touro poderia aumentar estas taxas em sistemas PIVE. No entanto, em casos de produção *in vitro* comercial, esse procedimento nem sempre é possível, em razão do custo e da disponibilidade de doses de sêmen (GONÇALVES et al., 2008).

Tempo e condições de transportes de ovócito e embriões

Devido à grande extensão territorial brasileira, as condições de transporte dos ovócitos bovinos aos laboratórios de PIVE são consideradas fatores limitantes em escala comercial. Muitas fazendas com grandes rebanhos bovinos em que os animais são utilizados como receptoras, estão localizadas em áreas novas de produção, como no norte e nordeste do Brasil, enquanto que os grandes centros de produção *in vitro* estão a grandes distâncias, nas regiões sul e sudeste (MARINHO et al., 2012). Em algumas ocasiões o tempo de transporte pode interferir diretamente na viabilidade dos ovócito e dos embriões, e para o sucesso da técnica a qualidade dos ovócitos e dos embriões é de extrema importância (BARUSELLI et al., 2012; MARINHO et al., 2012; LOIOLA, 2013).

O transporte dos ovócitos, das fazendas até os laboratórios de PIVE, vem sendo testado, para garantir a viabilidade e competência ovocitária, preservando sua capacidade de sofrer maturação, fecundação e assim produzir embriões viáveis (LEIVAS et al., 2004; TESSMANN et al., 2004; MIRANDA et al., 2007; LOIOLA, 2013). Os testes para transporte tem sido realizados em tubos de poliestireno (BYRD et al., 1995; KAISER et al., 1999), estufas portáteis (SUZUKI et al., 1997; DONG et al., 2001; SILVA, 2009), placas de cultivo mantidas em bolsas plásticas seladas e gaseificadas, em banho maria (VAJTA et al., 1997; OLIVIER; PALMA; ALBERTO, 1998; PALMA et al., 1998; KURTZ FILHO et al., 2002); em criotubos com diferentes meios de transporte e maturação (TWAGIRAMUNGU et al., 1998; KAISER et al., 1999; MIRANDA, 2004; TESSMAN et al., 2004; SILVA, 2009).

O uso de incubadoras portáteis ligadas a uma bateria para transporte dos ovócitos e embriões tem como objetivo, simular a MIV e a CIV em laboratório, permitindo assim, tanto a maturação dos ovócitos, quanto o cultivo dos embriões enquanto estes são transportados, o que possibilita a execução de todo o processo de produção *in vitro* sem nenhuma interrupção até o momento de transferência para as receptoras (MAX et al., 2012). Esse processo é realizado em estufa de cultivo com 5% de CO₂, em meios que contenham bicarbonato como tampão para o controle do pH (GORDON, 1994). Por outro lado, quando não se tem uma atmosfera gasosa controlada, é necessária a adição, no meio de maturação e de cultivo, de um tampão orgânico como o Hepes (WOLF et al., 1998; WARD; ENRIGHT; BOLAND, 2000).

Poucos são os estudos envolvendo transporte de embriões e os resultados apresentados na literatura ainda são controversos (ALVES et al., 2003; ARRUDA et al., 2012). Sendo assim, o estudo de estratégias de transporte de ovócitos e de embriões por longas distâncias, assim como, a inovulação do embrião transportado por longas distâncias em diferentes sincronias receptora-embrião sobre os resultados destes procedimentos, possibilitará um melhor entendimento e elementos auxiliares ao emprego desta tecnologia por técnicos e criadores (PONTES et al., 2010).

O transporte de embriões a longas distancias e o uso de sêmen sexado são importantes procedimentos para o uso racional de receptoras de embrião, melhorando a eficiência dos programas de produção de embriões em larga escala, principalmente quando se trata de embriões de gado de leite (PONTES et al., 2010).

Vários estudos foram conduzidos buscando simular o transporte de embriões em diferentes condições e por variados períodos (YANG et al., 1991; HASLER et al., 1997; MEZALLIRA et al., 2004). De acordo com Ramos et al. (2006), a simulação de transporte em palhetas de 0,25mL por até 12 horas, não interferiu na viabilidade embrionária, quando analisada a taxa de eclosão dos embriões.

Também simulando o transporte em palhetas, Brum et al. (2002) não encontraram diferença em relação a taxa de eclosão e números de células quando comparado com o cultivo em placas, afirmando ser uma forma prática, na qual os blastocistos bovinos podem continuar o seu desenvolvimento enquanto são transportados por longas distâncias para serem transferidos.

Após o transporte por seis horas em meio TCM-Hepes + 10% de soro de vaca em estro (SVE) em temperatura ambiente (22-25°C), blastocistos produzidos *in vitro* foram transferidos para receptoras, obtendo-se taxa de gestação de 33,3%

(MEZZALIRA et al., 2004). Contudo, Yang et al. (1991) mostraram que a taxa de gestação para embriões produzidos *in vitro* está inversamente proporcional ao tempo de transporte.

Uma alternativa para longas distâncias entre os laboratórios e as fazendas onde estão às receptoras é o transporte de embriões durante estádios iniciais de desenvolvimento, no próprio meio de cultivo. De acordo com a distância, e o tempo necessário para a viagem faz-se o transporte dos embriões em diferentes estádios do desenvolvimento, de forma que o fim do transporte coincida com o fim do cultivo, ou seja, o dia sete do CIV, sendo o dia 0 o dia da FIV. Assim as últimas etapas de desenvolvimento ocorrem durante o transporte, sendo este realizado em incubadoras portáteis simulando as condições do laboratório (PONTES et al., 2010).

Sincronia receptora – embrião

A variabilidade nos resultados das transferências de embriões produzidos *in vitro* também é um dos entraves para a sua expansão, e parte dos problemas está relacionada com as receptoras (MARINHO et al., 2012). Entre os fatores que afetam as taxas de gestação, a sincronia entre o trato reprodutivo da receptora e o embrião no momento da inovulação é de grande relevância (ANDRADE et al., 2012). O crescimento folicular final e o diâmetro do folículo dominante são fatores chaves que podem interferir significativamente na qualidade do ovócito, ovulação, ambiente uterino e, conseqüentemente, nos resultados de gestação (BARUSELLI et al., 2012).

Considerando-se que a taxa de sobrevivência embrionária após a TE envolve complexas inter-relações entre embrião, ambiente uterino e corpo lúteo (CL), as menores taxas de gestação utilizando embriões produzidos *in vitro* podem estar associadas ao subdesenvolvimento de alguns embriões, à assincronia útero embrionária e a má qualidade do CL das receptoras, resultando em uma falha no reconhecimento materno da gestação (REIS et al., 2006; HAAS et al., 2007).

As taxas de blastocistos bovinos oriundos de ovócitos maturados e fertilizados *in vitro* são relativamente baixas, visto que somente em torno de um terço (LONERGAN et al., 1994; DAYAN; WATANABE; WATANABE, 2000), 15 a 20% (HENDRIKSEN; VOS, 2000), 35% (DAYAN, 2001) ou 31 a 45% (WATANABE et al., 2010) dos ovócitos selecionados morfológicamente, antes de serem submetidos a maturação *in vitro*, resultam em embriões viáveis (RENESTO, 2004). Essa variação

pode estar diretamente relacionada ao fato de que o ovócito para ser fertilizado *in vivo* é obtido por meio da ovulação de um folículo saudável, durante uma fase específica do ciclo estral e os ovócitos aspirados para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes estágios do desenvolvimento (LONERGAN et al., 1994; HENDRIKSEN; VOS, 2000), em fases distintas do ciclo estral, portanto expostos à diferentes concentrações de FSH, podendo levar a uma diminuição na competência ovocitária (MACHATKOVA, et al., 2004).

Sakaguchi et al. (2002) encontraram variação nos resultados quando os embriões foram inovulados em momentos diferentes, obtendo maior taxa de gestação em receptoras que deram cio no dia da FIV. Dias et al. (2006) descreveram que a taxa de gestação foi influenciada pela sincronia embrião-receptora e consideraram esta variável como uma das mais importantes na seleção das receptoras em programas de produção de embriões.

Maiores conhecimentos da função ovariana, por meio da ultrassonografia (BARUSELLI et al, 2004), permitiram a elaboração de protocolos eficientes em controlar o crescimento folicular em fêmeas bovinas, possibilitando uma eficiente sincronização, com altas taxas de aproveitamento de receptoras (85-90%) (RODRIGUES et al, 2010) e viabilizando programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) em larga escala (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Local

As aspirações foliculares foram realizadas na Fazenda Douradinho, localizada no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, nos períodos de outubro de 2012 a maio de 2013. A produção *in vitro* de embriões foi realizada no laboratório Vitrogen em Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Os embriões foram transferidos para receptoras na Fazenda Paraíso, localizada no município de São José do Xingu, Mato Grosso, Brasil, distante 1.600 quilômetros de Uberlândia.

Animais

Foram utilizadas 96 doadoras da raça Gir, de diferentes idades, para realização do processo de aspiração folicular, sendo todas as doadoras com escore de condição corporal igual ou superior a três. Durante todo o período do experimento, as doadoras foram mantidas em pasto de capim *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* cv. *Tanzânia*, com suplementação mineral, ração e água *ad libitum*. Todas as doadoras recebiam a dose de 10 ml de suplemento com vitamina B12 (Catosal[®] B12 – Pfizer) e 10 ml de suplemento com vitamina A, D, E (ADEThor – Tortuga) de 15 em 15 dias.

Foram utilizadas novilhas da raça Nelore e cruzamentos de Nelore com Caracu, como receptoras de embriões, com peso corporal igual ou superior a 320 quilos e escore de condição corporal igual ou superior a três. Durante todo o período do experimento, as receptoras foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha*, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Todas as receptoras foram previamente avaliadas por meio de exame ginecológico com auxílio de aparelho de ultrassonografia (Aloka SSD - 500), vacinadas contra rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), leptospirose, parainfluenza tipo 3 (PI3), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) com a vacina CattleMaster[®] 4 + L5 (Pfizer), contra botulismo com a vacina Linovac[®] (Merial), carbúnculo sintomático, gangrena gasosa, tétano, morte súbita por clostrídeos, doença do rim polposo, enterotoxemia hemorrágica, hepatite necrótica infecciosa, com a vacina Sintoxan[®] T (Merial), febre aftosa e vermífugo (Dectomax[®] – Pfizer) 30 dias antes de iniciar os protocolos de TETF.

Aspiração folicular

As aspirações ocorreram respeitando-se um período mínimo de 21 dias entre elas. Realizadas sempre pelo mesmo profissional, utilizando aparelho de ultrassonografia Aloka SSD - 500, com guia de aspiração e bomba de pressão, com aquecedor de tubo da WTA. As aspirações eram realizadas sob pressão de 80 mmHg.

As doadoras foram anestesiadas, higienizadas e com o transdutor do ultrassom acoplado à guia de aspiração, os folículos ovarianos foram visualizados e aspirados mediante introdução de um cateter de 18 G (Jelco[®] Plus). Por meio do sistema de bomba de vácuo (WTA), os ovócitos foram recuperados juntamente com líquido folicular para um tubo coletor.

A seleção e classificação dos ovócitos foram realizadas na própria fazenda, em local apropriado, também sempre pelo mesmo profissional. O local para procura e seleção dos ovócitos era higienizado, com solução de Lysoform[®], um dia antes das aspirações. A procura e seleção foram feitas utilizando-se esteriomicroscópio Nikon[®] SMZ-1, com aumento de 10X. Os ovócitos eram selecionados e classificados de acordo com o número de camadas de células do cumulus e os aspectos do citoplasma do ovócito em grau I, II, III, sem cumulus, degenerados e atresícos, somente os considerados viáveis eram armazenados (Grau I, II e III). Após a seleção os ovócitos eram armazenados em criotubos, contendo 500 microlitros de meio de maturação e 300 microlitros de óleo mineral e passados por uma mistura de gases de dióxido de carbono 5%, oxigênio 5% e balanço em nitrogênio, esse gás é mistura padrão primária, gás comprimido. Os criotubos foram devidamente identificados, fechados e armazenados em transportadora de ovócitos TO – 16i da WTA, com controle de temperatura a 38,0°C.

As aspirações foliculares foram feitas em sete programações com intervalo de 21 dias entre elas. Cada programação foi realizada em três dias de aspiração, com três dias de transferência à distância, correspondentes. Todos os embriões saíram de Uberlândia para serem transferidos, no sétimo dia de cultivo. Dessa forma eram transportados no 6º, 5º e 4º dia de cultivo permanecendo 24, 48 e 72 horas, respectivamente, sob condições de cultivo em incubadora portátil (Figura 1).

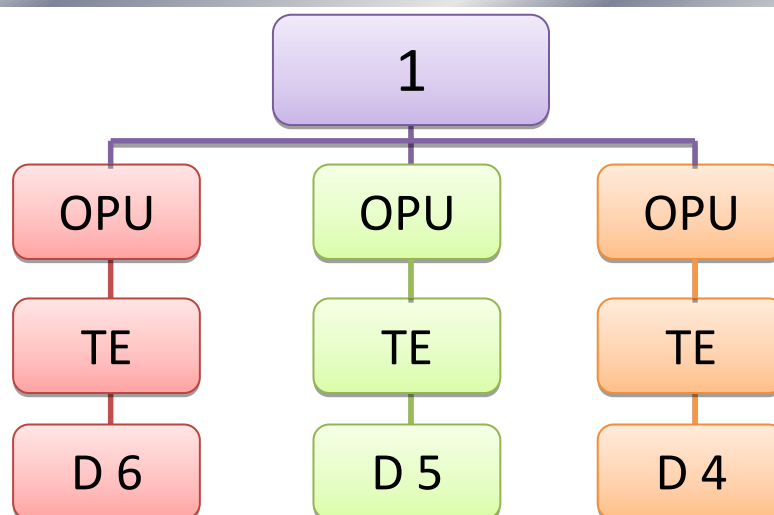


Figura 1: Ciclo de programação de aspiração folicular, realizadas na Fazenda Douradinho em Uberlândia, Minas Gerais e transporte de embriões com transferência na Fazenda Paraíso em São José do Xingu, Mato Grosso, Brasil.

Produção *in vitro*

No laboratório de PIVE, os ovócitos foram transferidos para placas com meio de maturação e colocados em estufa com temperatura de 38,5°C, com uma atmosfera gasosa de CO₂ (5%), O₂ (20%) e balanço em nitrogênio.

Após 24 horas do início da aspiração os ovócitos eram fertilizados com sêmen referente ao acasalamento estabelecido. Todos os ovócitos foram fertilizados com sêmen sexado para fêmea. Após a FIV, os ovócitos eram transferidos para placas com meio de cultivo do laboratório Vitrogen de Uberaba.

Para realização da transferência à distancia os embriões eram enviados nos dias 6, 5 e 4 do cultivo, permanecendo 24, 48 e 72 horas, respectivamente, sob condições de cultivo na incubadora portátil, de acordo com os dias que ocorreram as aspirações. Os embriões eram colocados em criotubos, identificados com o número da doadora e transportados em incubadoras portáteis – LABMIX – WTA, com controle de CO₂ e temperatura de 38,8°C e trocas de gás ocorrendo de 4 em 4 horas, para garantir melhor desenvolvimento dos embriões.

Os embriões eram retirados das placas com meio de cultivo e colocados em criotubos, também com 500 microlitros de meio de cultivo e 300 microlitros de óleo mineral, com tampas furadas, para passagem do gás da incubadora, para dentro dos criotubos (Figura 2). Dentro da incubadora também era colocado um tubo contendo

água, para garantir a umidade do ambiente, simulando o ambiente da estufa do laboratório de PIVE.



Figura 2: Criotubo com embriões em dia 5 de cultivo com tampa furada para passagem de gás da incubadora para cultivo dos embriões.

Envase dos embriões à distância

Para realização do envase dos embriões no dia 7 do cultivo, foi montado um local para manipulação, classificação e envase dos embriões, com meio TE, sendo esse o mesmo utilizado no laboratório. Esse local foi higienizado com Lysoform[®], um dia antes de iniciar os trabalhos de envase. Os embriões foram classificados de acordo com os critérios da IETS (1998) e Cenargen e Embrapa (2001), em blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (Bx), blastocisto em eclosão (BN), blastocisto eclodido (Be), envasados e devidamente identificados com as respectivas doadoras.

Protocolo de TETF

As receptoras foram sincronizadas com implante intra vaginal de progesterona (DIB – Schering Plough[®]) e 2 ml de benzoato de estradiol (RIC –BE – Tecnopec[®]) no dia zero, no dia cinco, foram aplicados 2 ml de prostaglandina (Clocio - Mogivet[®]) e 1,5ml de eCG (gonadotrofina coriônica equina) (Folligon - Intervet[®]) (300 UI). No dia nove foram retirados os implantes intra vaginais e aplicado 0,5 ml de cipionato de estradiol (ECP - Pfizer[®]), com a transferência dos embriões em tempo fixo no dia 17 (Figura 3).

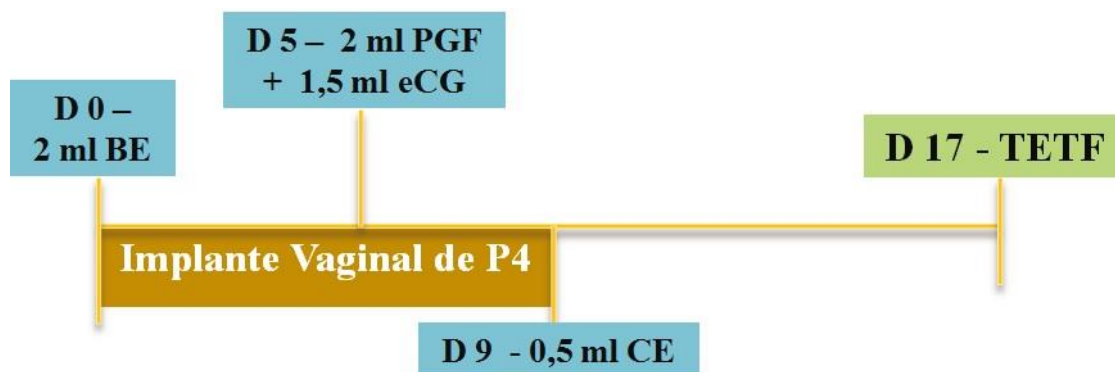


Figura 3: Protocolo de sincronização das receptoras, Fazenda Paraíso em São José do Xingu, Mato Grosso, Brasil.

Transferência dos embriões

A qualidade do corpo lúteo das receptoras foi avaliada por palpação retal no momento da transferência dos embriões, de acordo com a localização: ovário direito ou esquerdo e qualidade 1, 2 e 3, sendo 3 – grande, 2 – médio, 1 – pequeno.

Nas receptoras tratadas para TETF que possuíam CL, realizou-se a anestesia epidural com deposição de 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% com 0,04% de cloridrato de xilazina (BLOC® – J. A. Saúde Animal) no espaço sacro-coccígeno. Enquanto isso, o aplicador foi preparado introduzindo a palheta contendo o embrião no interior do mesmo e envolvendo-o com bainha para TE e camisa sanitária. Todas as inovulações dos embriões produzidos *in vitro* foram realizadas no corno ipsilateral ao corpo lúteo, por médico veterinário, com grande experiência com a técnica de transferência de embriões em bovinos.

Após 30 dias da transferência, foi realizado o primeiro diagnóstico de gestação por ultrassonografia (Aloka SSD – 500), com transdutor linear de 5,0 MHz de frequência, e 60 dias após a transferência foi realizado outro diagnóstico de gestação para avaliar a taxa de perda de gestação aos 60 dias.

Análises estatísticas

Na análise estatística realizou-se o teste não paramétrico binomial de duas proporções, com significância de 5%, para se determinar a ocorrência das diferenças de taxas de produção de blastocistos e taxas de gestação, dos embriões transportados em

cultivo por 24, 48 e 72 horas. Esta análise foi realizada pelo Biostat (Biasi; Ferreira, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aspirações foliculares foram feitas em sete programações, sendo três dias de aspiração em cada uma. Um total de 9.375 ovócitos viáveis foi recuperado em 535 aspirações, realizadas em $76,42 \pm 9,28$ doadoras em cada programação, com média de $17,49 \pm 0,97$ ovócitos viáveis por doadora (Tabela 1).

Tabela 1: Número de doadoras da raça Gir aspiradas por programação e produção de ovócitos por doadora/aspirações, com médias e desvio padrão realizadas em Uberlândia, Minas Gerais.

	Quantidade
Doadoras / programação	$76,42 \pm 9,28$
Ovócitos viáveis / programação	$1.339,29 \pm 195,80$
Ovócitos viáveis / doadora / aspiração	$17,49 \pm 0,97$

Diversos autores tem relatado a recuperação dos ovócitos viáveis por doadoras da raça Gir, com as seguintes taxas 10,9 (RENESTO, 2004), 11,6 (VIANA et al., 2004), 12,1 (PONTES et al., 2009), 17,1 (PONTES et al., 2010), 7,0 (VIANA et al., 2010) e 10,8 (SALES, 2011), resultados estes inferiores aos obtidos nesse programa. Esse fato pode estar relacionado com a preparação feita nas doadoras com aplicação de vitaminas A, D e E, e suplemento vitamínico, assim como Evangelista (2010), que obteve aumento médio de $3,9 \pm 1,6$ ovócitos por aspiração, quando realizado o tratamento das doadoras com vitamina A e E.

Hidalgo et al. (2005) relataram o efeito da vitamina A nos ovócitos bovinos durante o crescimento e maturação folicular, proporcionando maior recrutamento dos folículos. Essa vitamina pode ser um dos principais fatores controladores do recrutamento, seleção e crescimento dos folículos dominantes (SCHWEIGERT; ZUCKER, 1988) com ação sobre as células da granulosa do folículo ovariano (SHAW et al., 1995; SALES, 2005). As células da granulosa tem um papel importante durante a aquisição da competência ovocitária na maturação *in vitro* (VARAGO; MENDONÇA; LAGASRES, 2008) e *in vivo* (GILCHRIST, 2008).

Para a realização das transferências dos embriões, os mesmos foram transportados e cultivados por 24, 48 e 72 horas em incubadoras portáteis, sendo

aspirados 2.755, 3.195 e 3.425 ovócitos, respectivamente (Tabela 2). Em média $3.125 \pm 340,44$ ovócitos por dia de transporte e cultivo, com coeficiente de variação de 10,89%, o que demonstra que a distribuição dos ovócitos ao longo dos períodos de transporte e cultivo foi homogênea.

Tabela 2: Aspirações e produção de ovócitos viáveis para transporte e cultivo por 24, 48 e 72 horas de doadoras da raça Gir aspiradas em Uberlândia, Minas Gerais.

	24 horas	48 horas	72 horas	Média	Total
Número de aspirações	145	194	196	$178,33 \pm 28,88$	535
Ovócitos viáveis	2.755	3.195	3.425	$3.125 \pm 340,44$	9.375

Na produção de embriões *in vitro* obteve-se taxa de blastocisto de 18,19%, 22,28% e 22,72% nos transportes e cultivo por 24, 48 e 72 horas, respectivamente, com diferença estatística para o tempo de 24 horas ($p < 0,0001$). As médias de embriões produzidos por aspiração foram de 3,46, 3,67 e 3,97 nos períodos de 24, 48 e 72 horas de transporte e cultivo, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Taxas de blastocistos pós-transporte/cultivo por 24, 48 e 72 horas de doadoras da raça Gir aspiradas em Uberlândia, Minas Gerais.

	24 horas	48 horas	72 horas	Total
Embriões produzidos (%)	$18,19^b$ (501/2.755)	$22,28^a$ (712/3.195)	$22,72^a$ (778/3.425)	$21,24$ (1.991/9.375)
Média embriões / aspiração	3,46 (501/145)	3,67 (712/194)	3,97 (778/196)	

Letras diferentes nas linhas diferem entre si, pelo Teste binomial de duas proporções, com significância de 5% ($p < 0,05$), pelo programa Biostat.

Pontes et al.(2010) obtiveram produção de 18,9% de embriões, em doadoras da raça Gir, acasaladas com sêmen sexado de touro Holandês, em um programa de transferência em larga escala, transportando os embriões por um período de 24 a 72 horas, em microtubos contendo 400 μ l de meio de cultura e 300 μ l de óleo mineral.

Além disso, Pontes et al. (2010) obtiveram produção de embriões de doadoras de outras raças (18,7% em Holandesa e 17,4% de doadoras ½ Holandes ½ Gir).

A raça pode influenciar significativamente na eficiência da OPU e PIVE comercial. Entretanto, o efeito das diferentes raças ainda não é muito bem elucidado (BARUSELLI et al., 2012), mas alguns já foram identificados, incluindo idade (SARTORI et al., 2004), estado nutricional (OLIVEIRA et al., 2002), número de partos (LUCY et al., 1991; GINTHER et al., 1996), estresse térmico (WOLFENSON et al., 1995) e número de procedimentos de aspiração folicular (PONTES et al., 2009).

Quando se comparam as raças podemos observar que existem diferenças nas taxas de produção *in vitro* de embriões. Para doadoras holandesas, Bousquet et al. (1999) conseguiram média de 4,3 embriões/aspiração, enquanto Pontes et al. (2010), conseguiram média de 2,1 embriões/aspiração em doadoras holandesas. Quando aspiraram doadoras da raça Gir, Pontes et al. (2010) obtiveram 3,2 embriões/aspiração e Sales (2011) obteve 3,8 embriões/aspiração. Já em doadoras da raça Nelore, Pontes et al. (2009) obtiveram 5,1 embriões/aspiração. Quando aspiradas doadoras ½Holandês ½Gir, Pontes et al. (2010) obtiveram média de 3,9 embriões/aspiração. No presente estudo, as médias de embriões por aspiração foram semelhantes às dos outros estudos em doadoras Gir. Vale lembrar que as condições de transporte dos embriões do presente estudo foram semelhantes às de Pontes et al. (2010), porém Bousquet et al. (1999), Viana et al. (2004), Sales (2011) e Silva (2011) trabalharam o cultivo dos embriões apenas em laboratório. Silva et al. (2011) observaram que quanto maior o tempo de transporte dos ovócitos até o laboratório, menores foram as taxas de produção de blastocistos. Em relação ao transporte de embriões, observamos o contrário, os embriões que tiveram menor tempo de transporte obtiveram menor taxa de produção de blastocistos (24 horas – 18,19%, 48 horas – 22,28%, 72 horas – 22,72%).

Se observarmos os resultados de produção de embriões nesse experimento, e os resultados de outros estudos em que a produção de embriões e envase são feitos no laboratório (31,8% (VIANA et al., 2004), 34,3% (SILVA, 2009), 34,2% (SILVA et al., 2011), 37,29% (PONTES et al., 2011)), verificamos que os resultados foram menores que as produções de embriões pelo método tradicional. A diferença da produção de embriões entre os tempos de transporte e cultivo e os valores abaixo das médias gerais, pode ser explicada pela logística de transporte dos embriões sobre diferentes tempos de cultivo em incubadoras portáteis.

Quando comparamos a produção de embriões entre os tempos de transporte e cultivo, observamos que o transporte por 24 horas de cultivo em incubadoras portáteis obteve menor taxa de produção de embriões. Sabe-se que é durante o período de cultivo *in vitro* ou *in vivo* (SANGILD et al., 2000), que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003). No 6º dia de cultivo se visualiza a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele (THOMPSON, 2000). Dessa forma, podemos supor que a menor produção de embriões no transporte e cultivo por 24 horas tenha ocorrido, por terem sido manipulados, ou seja, transferidos das placas e estufas do laboratório, para os criotubos e incubadora portátil, em um momento importante para o desenvolvimento embrionário, fase de compactação dos blastômeros e não tiveram tempo suficiente para se recuperarem, visto que a mesma manipulação ocorreu nos outros tempos de transporte e cultivo, porém esses permaneceram sob as condições da incubadora portátil por mais tempo.

Do total de embriões produzidos (n=1.991), foram transferidos 1.923 embriões em receptoras da raça Nelore e cruzadas. Os resultados de taxa de concepção aos 30 e 60 dias foram semelhantes em todos os dias de transporte e cultivo dos embriões, obtendo-se taxas de 44,51%, 42,82% e 44,66% aos 30 dias pós TE, nas 24, 48 e 72 horas de transporte e cultivo, respectivamente e 41,12%, 40,99% e 42,42% aos 60 dias pós TE, nas 24, 48 e 72 horas de transporte e cultivo, respectivamente (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram obtidos por Pontes et al. (2009), com transporte semelhante ao utilizado nesse estudo (40% de taxa de gestação, com embriões de doadoras Gir aos 60 dias pós TE). Andrade et al. (2012) obtiveram 39,1% de taxa de concepção com embriões da raça Nelore e 37,6% em embriões da raça Senepol, em condições de transporte tradicional. Rebelo (2008) e Andrade et al. (2012), não observaram diferença nas taxas de concepção quando compararam raças de embriões. Brum et al. (2002) visando observar o desenvolvimento embrionário do D7 ao D9, utilizaram métodos diferentes de cultivo (em placas e em palhetas de 0,25) e observaram que blastocistos bovinos produzidos *in vitro* podem ser cultivados individualmente do D7 ao D9, não havendo efeito se cultivados em placas ou palhetas sobre a taxa de eclosão e o número de células.

Tabela 4: Taxas de concepção dos embriões produzidos *in vitro* de doadoras da raça Gir, no transporte e cultivo por 24, 48 e 72 horas, aos 30 e 60 dias pós TE, na Fazenda Paraíso, São José do Xingu, Mato Grosso, Brasil.

	24 horas	48 horas	72 horas	Total
Total embriões transferidos	501	710	712	1.923
Concepção	44,51	42,82	44,66	43,94
30 dias (%)	(223/501)	(304/710)	(318/712)	(845/1923)
Concepção	41,12	40,99	42,42	41,55
60 dias (%)	(206/501)	(291/710)	(302/712)	(799/1923)
Perda gestacional	7,62	4,27	5,03	5,44
(%)	(17/223)	(13/304)	(16/318)	(46/845)

Teste binomial de duas proporções, com significância de 5% ($p < 0,05$), pelo programa Biostat.

Os resultados de perda gestacional no diagnóstico aos 60 dias foi inferior aos obtidos por Galli et al. (2001) que obtiveram taxa de 10 a 12% de perda gestacional nos 60 dias pós TE e Rodrigues et al. (2010) que obtiveram 9,0 e 11,9% de perda gestacional aos 60 dias pós TE. Pontes (2009) obteve uma taxa de perda gestacional inferior ao desse estudo, de 3,5% (Tabela 4). Em todos os estudos descritos acima, a produção *in vitro* de embriões foi realizada em laboratório.

Sendo assim, provavelmente, o método de transporte dos embriões não altera a taxa de gestação, desde que o embrião seja de boa qualidade. Sabe-se que embriões com qualidade inferior têm baixas taxas de implantação devido a várias razões, dentre elas a produção de interferon tau e menor contato com a superfície do epitélio endometrial, devido ao insuficiente alongamento do embrião, resultando em perda embrionária, devido ao não reconhecimento materno (SPENCER et al., 2004; BINELLI, 2000; BAUERSACHS, 2013).

Quando se fala de cultivo *in vitro* de embriões, se baseia muito na composição dos meios de cultivo (BLUME et al., 1997; MACHADO, 2011), condições de temperatura (DONG et al., 2001), atmosfera gasosa (MIRANDA, 2004), adição de aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento (DONG et al., 2001) e uso de soro

(NAGAI, 2001), porém poucos estudos falam de transporte dos embriões durante o cultivo e como esse transporte e cultivo podem interferir na produção de blastocistos.

CONCLUSÃO

O transporte e cultivo de embriões por 24, 48 ou 72 horas antes da transferência, em incubadoras portáteis, mostraram-se viáveis, quanto às taxas de concepção, entretanto a taxa de produção de blastocisto foi menor quando o transporte e cultivo ocorreram por 24 horas.

REFERENCIAS

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p.390-396, 2002.

ALVES, D.F. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-Hepes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.40, p.279-286, 2003.

ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; LEMES, K. M.; SILVA, D. F.; RODRIGUEZ, S. A. F.; AFFONSO, F. J. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 345-353, 2012.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BÓ, G.A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, n. 4, p. 134-141, 2012.

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

BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 97, p. 20– 26, 2013.

BIASI, N. G.; FERREIRA, D.F. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de k populações independentes. **Revista Brasileira Biomédica**, v. 27, n.3, p. 301-323, 2009.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. **Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral de ruminantes**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, 2000.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES, J.R.A.P.; SATURNINO, H.M. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.78-81, 1997.

BÓ, G. A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 1-22, 2004.

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

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

BRUM, D. S.; LEIVAS, F. G.; BERNARDI, M. L.; RAUBER, L. P.; MEZZALIRA, A.; BRASS, K. E.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 2002.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.6, n.11, 2008.

BYRD S.R.; FLORES-FOXWORTH G.; WESTHUSIN M.E. Normal ovine embryo development following *in vitro* oocyte maturation in a portable incubator in the absence of CO₂. **Theriogenology**. v.43, p.179, 1995.

CENARGEN , EMBRAPA. **Fecundação *in vitro* (FIV)**. 2001. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/biotec/ari/fecun.html>>. Acesso em: 14 jun. 2011.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction Domestic Animal**, v. 36, p. 3-9, 2001.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 181- 185, 2000.

DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. Dissertação (Mestrado), 55p., Unesp, Botucatu, 2001.

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

DONG, Y.J.; VARISANGA, M.D.; MTANGO, N.R.; AONO, M.; AONO, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO₂ INCUBATOR. **Reproduction in Domestic Animals**. v.36, p.313-318, 2001.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? **Journal of Reproduction and Fertility**., v.93, p.63-70, 1991.

EPPIG, J.J., VIVEIROS, M.M., BIVENS, C.M., DE LA FUENTE, R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: LEUNG, P.C., ADASHI, E.Y. (Eds.), **The ovary**. 2004.

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

EVANGELISTA, J.J.F. **Ação farmacológica das vitaminas A & E na produção de oócitos e embriões bovinos**. 2010.108f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FERREIRA, M.B.D. **Obtenção de oócitos e produção in vitro de embriões em doadoras lactantes da raça gir (*Bos Taurus Indicus*)**. 2011. 159f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

FERRO, A.C.; SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; CRESPILO, A.M.; MARTINS JR., A. Produção de embriões *in vitro* em meio de cultura com ácido ascórbico. **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n.1, p.80-88. 2009.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.

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

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.

GAO, H.; BAJ, H.; SA, R.; WANG, H.; WANG, Z.; YUE, Y.; YU, H. The effect of valproic acid on bovine oocyte maturation and early embryonic development *in vitro*. **Cytotechnology**. 2013.

GILCHRIST, R.B. Oocyte-cumulus cell interactions regulating oocytes quality. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, suppl.2, p. 269-278, 2008.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. **Journal Reproduction Fertility**, v.109, p.181-186, 1997.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of dominant follicle in cattle. **Biology Reproduction**. v.55, p.1187–94,1996.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo. Editora Verela, 240 p. 2001.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. Cambridge: CAB International, University Press, 1994, 640p

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

HAAS, G.T.S. et al., Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embriões tratadas com somatotropina recombinante bovina. **Revista Ceres**, v. 54, n. 311, p. 026-032, 2007.

HAGEMANN LJ, BEAUMONT SE, BERG M, DONNISON MJ, LEDGARD A, PETERSON AJ, SCHURMANN A, TERVIT HR. Development during single ivp of

bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction Development**. v. 53, p. 451-458, 1999.

HASLER, J. F.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; STOKES, J. E. Survival of IVFderived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 48, p. 563-579, 1997.

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

HIDALGO, C.O.; DIEZ, C.; DUQUE, P.; PRENDES, J.M.; RODRIGUEZ, A.; GOYACHE, F.; FERNANDEZ, I.; FACAL, N.; IKEDA, S.; ALONSO-MONTES, C.; GOMEZ, E. Oocytes recovered from cows treated with retinol become unviable as blastocysts produced *in vitro*. **Reproduction**, n.129, p. 411-421, 2005.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review Cytology**. v.124, p.43-101, 1991.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

IBGE. **Estatística da produção pecuária**. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. 39p. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> : acessado em 27 de maio de 2013.

IETS. 1998. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW DA, SEIDEL SM. (Eds.). **3rd Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, IL, USA: International Embryo Transfer Society. p.103-116. 1998.

IRELAND, J.J Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.34, p. 39-54. 1987.

KAISER, G.; ALBERIO, R.; BRUM, D.S; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.; ALLER, J.; PALMA, G.A. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em

criotubos e em estufa portátil. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 230, 1999. Suplemento.

KURTZ FILHO, M.; SILVA, L.M.; MOREIRA, B.; BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos em tubos previamente gaseificados e mantidos em banho maria. **Archives of Veterinary Science**. v.7, n.2, p.121-127, 2002.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.3, p. 215-224. 2009.

LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; MEZZALIRA, A. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, p.219-224, 2004.

LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; POZZOBON, S.E. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em meio de maturação não gaseificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.25, p.414-415, 2001.

LOIOLA, M.V.G. **Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Bahia. 61p. 2013.

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

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

LUCCI, C.M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**. v.41, p.61-69, 2001.

LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L. Factores that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**. v.70, p.3615-3626, 1992.

LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W. Energy balance and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early post-partum dairy cows. **Journal Dairy Science**. v.74, p. 473-482, 1991.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal Reproduction Fertility**. v.81, p.301-307, 1987.

MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A..N. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, p.123-134, 2011.

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Mechanical and enzymatic isolation of preantral ovarian follicles in goat fetuses. **Ciência Animal**, v.12 (2), p. 83-91, 2002.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 229- 335, 2004.

MAREI, W.F.; GHAFARI, F.; FOULADI-NASHTA, A.A. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. **Theriogenology**. v.78. p. 670-677. 2012.

MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F.; MOINO, L. L.; RIGO, A. G.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 323-328, 2012.

MARTIN, G. B, *et al.* Interaction between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in ewe. **J. Anim. Fert.** v. 82, p.319-328, 1988.

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

MAX, M. C.; SANTOS, G. M. G.; MELO-STERZA, F. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; MOROTTI, F.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; BALDASSARRE, H.; SENEDA, M. *In vitro* embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo transport. **Small Ruminant Research**, v. 105, p. 286-289, 2012.

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

MEZZALIRA, A.; SANTOS, R. M.; BARRETA, M.; CUCCO, D.; MEZZALIRA, J.; WENTZ, K. C.; CRUZ, F. B. Transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*: efeito da vitrificação e do transporte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 164, 2004. (suplem)

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira Reprodução Animal.** v.31, n.2, p. 218-223. 2007.

MIRANDA, M.S. **Avaliação de um sistema de cultivo de baixo custo na produção *in vitro* de embriões.** Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NAGAO, Y.; IIJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during *in vitro* development of bovine early embryos. **Zygote**. v.16, p.127–133. 2008.

NANZER, T.A.D.T. Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução. Artigos técnicos associação brasileira dos criadores de girolando. Disponível em:

<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/tecnico,39> Acesso em: 28-07-2014.

NAYUDU, P.L.; FEHRENBACH, A.; KIESEL, P.; URSULA, A.; VITT, K.A.T.T.I.; PANCHARATNA SUSAN OSBORN. Progress Toward Understanding Follicle Development *in vitro*: Appearances Are Not Deceiving. **Archives of Medical Research** 32 587–594, 2001.

O EMBRIÃO. Artigo técnico: Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. Sociedade **Brasileira de Tecnologias de Embriões (SBTE)**. Edição 51. p. 6. 2013. Disponível em <http://www.sbte.org.br/?op=paginas&tipo=secao&secao=5&pagina=14> Acesso em 22/05/2013.

OLIVEIRA, J.F.; NEVES, J.P.; MORAES, J.C.; GONCALVES, P.B.; BAHR, J.M.; HERNANDEZ, A.; COSTA, L.F. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. **Animal Reproduction Science**. v.73, p.1–10. 2002.

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

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

PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P. SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCINATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicustaurus dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010.

PONTES, J.H.F. **Aspectos aplicados da produção *in vitro* de embriões *Bos indicus***. 2009. 156p. Doutorado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2009.

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

RAMOS, A.A.; et al. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira Zootecnia**. v..35, n.6, p. 2285-2289. 2006.

RAMOS, A.A; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.341-347, 2006a.

RASMUSSEN, S.; BLOCK, J.; SEIDEL JR, G.E.; BRINK, Z.; MCSWEENEY, K.; FARIN, P.W.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**. v.79. p.453-461. 2013.

REBELO, C.S.S. **Influência do genótipo das doadoras de embriões bovinos (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) sobre a taxa de gestação**. 2008. Dissertação (Mestrado) -

Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.
Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/978>. Acessado em 12-07-2013.

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

RENESTO, A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular guiada por Ultrasonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)2004. 59f. – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RHEINGANTZ, M.G.T.; DESCHAMPS, J.C.; PIMENTEL, A.M.; PEGORARO, L.M.C. Influência dos métodos do gradiente de Percoll e do Swin-up sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.26, n.4, p. 312-316. 2002.

RIZOS D, LONERGAN P, BOLAND MP, GARCIA RA, PINTADO BF, GUTIERREZ AA. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocysts quality. **Biology of Reproduction**. v. 66 p. 589-595. 2002

ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A. and HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.657-665, 1998.

RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, F.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 110–117, 2010.

RODRIGUES, C.A.; RANIERI, A.L.; VIEIRA, L.M.; SILVA, P.R.L.; BARUSELLI, P.S. Aplicação prática das técnicas de reprodução em vacas de leite. **4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina – Paraná, 2010a.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

RUSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.
SAKAGUCHI, M.; GESHI, M.; HAMANO, S.; YONAI, M.; NAGAI, T. Embryonic and calving losses in bovine mixed-breed twins induced by transfer of *in vitro*-produced embryos to bred recipients. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 209-221, 2002.

SALES, J.N.S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. 2011. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SALES, J.N.S. **Resposta superovulatória e qualidade de embriões de novilhas e vacas holandesas suplementadas com duas doses de β -caroteno associado ao tocoferol**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SAMPAIO, R.V; SANTOS, S.S.D. **Isolamento, Estrutura e Quantificação de Folículos Pré-Antrais de Fetos Bovinos e Bubalinos**. Projeto de Pesquisa Iniciação Científica Universidade Federal do Pará. 2006.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SARENTONGLAGA, B.; OGATA, K; TAGUCHI, Y.; KATO, Y.; NAGAO, Y. The developmental potential of oocytes is impaired in cattle with liver abnormalities. **Journal of Reproduction and Development**. 2012.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal Dairy Science**. v.87, p.905–20, 2004.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, n. 2, p. 575-579, 1988.

SHAW, D.W.; FARIN, P.W.; WASHBURN, S.P.; BRITT, J.H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.44, p.51-58, 1995.

SHI, D.S.; AVERY, B.; GREVE, T. Effects of temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**. v.50. p.667-674. 1998.

SILVA, L.K.X.; REIS, A.N.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S.; SOUZA, A.J.O.; VALE, W.G. Transport of bovine oocytes in maturation medium for different periods of time without controlled gaseous atmosphere. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.74-80, 2011.

SILVA, L.K.X. **Transporte simulado de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém. 2009.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691-1704, 2004.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, Madison, v.39, n.2, p. 308-317. 1988.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. Implantation mechanisms: insights from sheep. **Reproduction**, v.128, p. 657-668, 2004.

SUH, C.S., SONNTAG, B., ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine e Metabolic Disorders.**, v. 3, p. 5-12, 2002.

SUZUKI T.; SUMANTRI C.; KHAN N.H.A.; MURAKAMI M. & SAHA S. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for production of bovine IFV embryos. **Theriogenology**, v.43, p.330, 1997.

TESSMANN, J. V.; MOZZAQUATRO, D. F.; RAUBER, L. P.; SANTOS, M. V.; CHEQUIM, R. M.; BERNARDIS, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 177-184, 2004.

THIBIER, M. Transfers of both in vivo-derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **IETS Newsletter**, 24:11-19. 2006.

THOMPSON, J.G.; LANE, M.; GILCHRIST, R.B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. **Society of Reproduction and Fertility**. Suplemento. v. 64, p. 179 – 190, 2007.

THOMPSON, J. G.; C. MCNAUGHTON, B.; GASPARRINI, L. T.; MCGOWAN, AND H. R. TERVIT. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal Reproduction Fertility**, v.118, p. 47-55. 2000.

TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**. v.49, p.299. 1998.

VILA, F. Sustentabilidade econômica e ambiental na pecuária: Uma abordagem sistêmica. **4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina-Paraná, 2010.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture a technique report. **Theriogenology**, v. 48, p.1379-1385, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VIANA, J.H.M.; PALHAO, M;P;; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**. v. 73, p. 966–972. 2010.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; SA, F.W.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES JUNIOR, A.P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**. v.84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509. 2000.

WARD, F.A.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**. v.53. p.306. 2000.

WATANABE, Y.F.; JOAQUIM, D.C.; CASTANEDA, S.; CAVALHEIRO, D.J.; CAPINZAIKI, C.R.L.; GOMEZ, R.G.; CORREA, C.A.H.; RODRIGUES, L.; DAYAN, A.; WATANABE, M.R. Produção comercial de embriões FIV na raça Brahma no

Brasil e Colômbia. In: CONGRESSO MUNDIAL DA RAÇA BRAHMA, 15. 2010. Uberaba. *Anais...* Uberaba. 2010.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology Reproduction**. v.62, n.2, p.355-364. 2000.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Suppl**, n.61, p.71-90, 2003.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility. Suppl.**, n.54, p.33-48, 1999a.

WEBB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E.; MOOR, R.M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**. v.68, p.257-284, 1999b.

WILLIAMS, C.J.; ERICKSON, G.F.; **Morphology and physiology of the ovary**. Endotext, Chapter 1, 2012.

WIT, A.A.; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal Animal Science**. v.78, n. 5, p. 1277-1283. 2000.

WOLF E., BOXHAMMER K., BREM G., PRELLE K., REICHENBACH H.D., REISCHL J., SANTL B., SCHERNTHANER W., STOJKOVIC M., WENIGERKIND H. & ZAKHARTCHENKO V. Recent progress in the *in vitro* production and cloning of bovine embryos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. 26 (supl):160-177. 1998.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; SÁVIO, J.D.; MEIDAN, R.; LEW, B.J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology Reproduction** v.52, p.1106–13, 1995.

YANG, N. S.; DUFF, R.; LU, R. H.; GORDON, I.; POLGE, C. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 297, 1991.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**. v.3, p.155-163, 1998.