

ANDRÉ DAYAN

**FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS MEDIANTE ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

Botucatu - SP

2001

ANDRÉ DAYAN

**FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS MEDIANTE ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Denise Lopes

Botucatu - SP

2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Dayan, Andre

Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante
aspiração folicular e fecundação *in vitro* / Andre Dayan – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

Orientador: Paulo Henrique Franceschini

1. Bovino – Embrião 2. Bovino - FIV 3. Bovino - OPU 4. Bovino –
Biotecnologia 5. Bovino – Reprodução

CDD 636.3089264
636.308926

Palavras-chave: Fecundação *in vitro*; Aspiração folicular; Biotecnologia;
Embrião; Bovino

DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. Botucatu, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO

As técnicas de aspiração folicular (OPU) e fecundação *in vitro* (FIV) vêm surgindo como uma alternativa importante para a produção de embriões bovinos. Estas técnicas aplicam-se tanto para vacas com problemas reprodutivos adquiridos, como para melhorar a performance de vacas saudáveis, gestantes, novilhas e animais de idade avançada. Vários trabalhos relatam fatores que interferem no processo de OPU-FIV. O presente trabalho tem como objetivo identificar alguns dos fatores que interferem na produção, como a influência da raça e da sazonalidade na recuperação de oócitos, produção de embriões e taxa de gestação; a influência do estágio de desenvolvimento embrionário e da sincronização da receptora no momento da transferência e, posteriormente, a

interação entre o estágio embrionário e a sincronização da receptora. Foram avaliadas 1.841 aspirações foliculares em 566 doadoras das raças Nelore, Brahman, Gir, Guzerá, Blond D'Aquitaine, Limousin, Holandesa e Pardo suíço em 29 propriedades. A idade das doadoras variou entre 12 e 240 meses. De um total de 19.659 oócitos viáveis, foram produzidos 7.116 embriões (36,20%), dos quais foram transferidos 3.572 embriões originando 1.147 gestações (32,11%). As raças Nelore e Blond D'Aquitaine apresentaram maior produção de oócitos ($15,52 \pm 3,15$ e $14,85 \pm 2,40$ respectivamente). A maior produção de embriões por sessão de OPU foi das raças Brahman, Blond D'Aquitaine e Nelore ($5,54 \pm 2,36$; $4,43 \pm 1,92$; $4,04 \pm 2,47$, respectivamente). No inverno a produção de oócitos foi superior ao outono ($15,22 \pm 3,62$ e $13,36 \pm 3,48$, respectivamente), no entanto a produção de embriões foi melhor no verão e outono ($4,35 \pm 2,38$ e $4,14 \pm 2,49$, respectivamente) e pior no inverno e na primavera ($3,46 \pm 2,31$ e $3,83 \pm 2,54$, respectivamente). A mesma relação foi observada na taxa de gestação para o verão, outono, inverno e primavera (36,26% $\pm 0,80$; 35,16% $\pm 0,80$; 27,18% $\pm 0,85$ e 29,21% $\pm 0,84$, respectivamente). Quanto à sincronização das receptoras, foi observada melhor taxa de gestação para a transferência dos embriões nos dias 7, 8 e 9 após o cio (38,01% $\pm 0,79$; 38,01% $\pm 0,79$; 38,78% $\pm 0,79$). Considerando apenas o estágio embrionário, isoladamente, verificou-se que quanto mais desenvolvido o embrião, melhor foi a taxa de gestação, onde blastocistos em eclosão, blastocistos expandidos, blastocistos propriamente ditos, blastocistos iniciais e mórulas apresentaram taxa de gestação de 43,90% $\pm 0,77$; 39,42% $\pm 0,86$; 32,01% $\pm 0,82$; 25,59% $\pm 0,86$ e 17,31% $\pm 0,76$, respectivamente.

Considerando os fatores observados no presente trabalho, pode-se concluir que o incremento da produção mediante as técnicas de OPU-FIV depende de vários fatores além da resposta individual da doadora. Podemos citar a influência da sazonalidade na produção *in vitro* de embriões e, principalmente a cinética do desenvolvimento embrionário associada à sincronização da receptora.

A minha mãe Vera e irmã Milena

Que apesar da distância e da saudade, participam e incentivam minhas atividades acadêmicas. Que sempre souberam que, mesmo distantes, estão sempre presentes, fazendo-me sentir em casa e nunca sozinho.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À agência de fomento à pesquisa FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 97/02003-2) pelo suporte financeiro;

Aos colegas e professores do departamento de Reprodução Animal da UNESP – *campi* Botucatu e Jaboticabal;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini e Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes, pela confiança, orientação e atenção dispendida durante todo o trabalho;

As minhas colegas e amigas exageradamente inseparáveis Yeda e Michele, pois foram elas que me trouxeram à luz da pesquisa em biotecnologia;

À toda equipe da Vitrogen, pelo ótimo trabalho e padronização dos resultados, em particular ao Márcio, Luciene, Eva, Danilo, Patrick, Anderson, Mônica e Diogo;

Ao amigo Flávio, que além de ajudar nas análises estatísticas, contribuiu na escolha do tema deste trabalho;

Aos colegas que a todo momento nos auxiliam: Sônia, Fabinho, Zanenga, Júlio, Zé Renato e Mineiro;

Aos colegas da pós graduação Karina, Raquel, Caliê, Marcelo, Buratini e aos que ainda estão nesta jornada;

Aos pecuaristas que tanto investem em tecnologia, em nome de Tonico e Rubico Carvalho, que deram amplo apoio à implantação do projeto, bem como na divulgação do mesmo no meio pecuário;

Finalmente à Ana Cláudia pela paciência e tolerância nas noites mal dormidas e nos dias de mau humor, necessários em qualquer dissertação.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. FISILOGIA OVARIANA.....	12
2.2. APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR	13
2.2.1. <i>Produção de maior número de embriões.....</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Menor intervalo entre gerações.....</i>	<i>14</i>
2.2.3. <i>Melhor aproveitamento dos animais.....</i>	<i>15</i>
2.2.4. <i>Produtos obtidos de vacas que não respondem à superovulação.....</i>	<i>16</i>
2.2.5. <i>Produtos obtidos de animais com problemas reprodutivos.....</i>	<i>17</i>
2.2.6. <i>Utilização de animais mortos.....</i>	<i>17</i>
2.3. FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO	18
2.3.1. <i>Doadoras.....</i>	<i>18</i>
2.3.2. <i>Raças.....</i>	<i>19</i>
2.3.3. <i>Touros.....</i>	<i>20</i>
2.3.4. <i>Frequência de aspiração.....</i>	<i>21</i>
2.3.5. <i>Equipamento utilizado para OPU.....</i>	<i>22</i>
2.3.6. <i>Variações entre operadores.....</i>	<i>23</i>
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODO.....	25
4.1. DOADORAS DE OÓCITOS	26
4.2. ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	26
4.3. LAVAGEM, SELEÇÃO E TRANSPORTE.....	27
4.4. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
4.5. FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	29
4.6. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	29
4.7. TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES	30
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1. INFLUÊNCIA DA RAÇA NA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS OÓCITOS E DOS EMBRIÕES OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR.	32
5.2. INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS OÓCITOS E DOS EMBRIÕES OBTIDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	33
5.3. INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO EM RELAÇÃO À TAXA DE GESTAÇÃO APÓS A TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES.....	35
5.4. INFLUÊNCIA DA SINCRONIZAÇÃO DA RECEPTORA NA TAXA DE GESTAÇÃO.....	36
5.5. INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NA TAXA DE GESTAÇÃO.	37
5.6. INTERAÇÃO ENTE O ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E A SINCRONIZAÇÃO DAS RECEPTORAS.....	39
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Devido a atual necessidade de incremento na produtividade pecuária, várias biotécnicas vêm sendo desenvolvidas, principalmente na espécie bovina. Inicialmente, a inseminação artificial (IA) teve um importante papel na disseminação do material genético do macho e, posteriormente, técnicas como o controle do ciclo estral, a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) proporcionaram um aumento na possibilidade da multiplicação do material genético oriundo da fêmea. Estas técnicas, sendo difundidas em vários países, contribuíram decisivamente para melhorar a qualidade e quantidade do produto final, quer seja carne ou leite. Em um segundo momento, a ultra-sonografia somou-se às técnicas existentes como importante recurso para a monitoração da atividade ovariana. Recentemente, a produção de embriões *in vitro* (PIV), com

oócitos de animais abatidos, constituiu novo marco na pesquisa da reprodução em bovinos.

Finalmente a possibilidade de obtenção de oócitos de animais vivos, mediante a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU), viabilizou o intenso aproveitamento do material genético de fêmeas superiores, além de proporcionar prole de fêmeas de alto valor genético oriunda de animais com problemas reprodutivos adquiridos, novilhas pré púberes, vacas gestantes e senis. Isso sem contar a grande pressão de seleção que é possível fazer, com o aumento da velocidade de multiplicação dos animais de alto valor genético e da utilização de novilhas para a OPU-FIV.

Deste modo, o presente trabalho busca uma melhor compreensão de alguns fatores que afetam os índices de aproveitamento neste regime de produção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fisiologia ovariana

No terço médio da gestação, o ovário do feto bovino já está repleto de oogônias e estas estão contidas em folículos primordiais (pré antrais, com uma única camada de células da granulosa). No último trimestre da gestação ocorrem os estádios iniciais do crescimento folicular (ERICKSON, 1966 ; MARION *et al.*, 1968). Ao nascimento existem cerca de 0,5 milhão de folículos nos ovários bovinos e estes, gradualmente deixam seu estado de dormência e iniciam o desenvolvimento para folículos antrais. Uma vez que se inicia o desenvolvimento irá ocorrer, ou a ovulação, ou a atresia. Praticamente todos os folículos dos ovários das fêmeas sofrem atresia. Isto pode ser demonstrado se for calculado

que, um animal ciclando normalmente num período de 15 anos vai ovular menos de 300 oócitos (ovulando a cada 21 dias ou 17,4 vezes ao ano, em 15 anos = 260 ovulações) dentre os 0,5 milhão existente ao nascimento (ERICKSON, 1966). Isto, sem considerar que, os animais chegam a passar metade de suas vidas gestantes. Fica claro portanto, que menos de 0,1% dos folículos chegam a ovular.

Aparentemente, são necessários 60 dias para que um folículo primordial ativado atinja o tamanho ovulatório (LUSSIER *et al.*, 1987). Neste período, seguindo um padrão de ondas foliculares (WILTBANK *et al.*, 1996), ocorrem várias fases de crescimento e atresia folicular com subsequente maturação ou degeneração oocitária.

2.2. Aplicações da técnica de aspiração folicular

2.2.1. Produção de maior número de embriões

Uma vez que pela monta natural ou inseminação artificial (IA), pode-se obter apenas um produto por vaca ao ano, novas biotécnicas foram desenvolvidas para acelerar o processo de melhoramento genético. Assim, com o advento da superovulação e posterior transferência de embriões (SOV-TE), foi possível obter-se em média a produção de 25 embriões ao ano, totalizando cerca de 100 embriões na vida reprodutiva de uma vaca (SAUMANDE *et al.*, 1984).

WATANABE *et al.* (1998a) obtiveram produção entre 0,6 e 3,5 embriões por sessão de OPU, com média de 1,5 embrião por semana. Já KRUIP *et al.* (1994), estudando a eficácia da punção folicular transvaginal guiada por ultra-som

(OPU) em vacas leiteiras e de corte, obtiveram média de 8,0 oócitos por sessão de OPU, sendo que 16% desenvolveram em embriões transferíveis após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (MIV; FIV; CIV, respectivamente). NIBART *et al.* (1995) obtiveram taxa de gestação de 40 a 50% ao transferirem embriões obtidos por aspiração folicular seguida de fecundação *in vitro* (OPU-FIV). Baseado no número médio de oócitos colhidos por sessão, foi possível transferir 2 embriões/semana/vaca, resultando, em média, 1 prenhez/semana. DAYAN *et al.* (2000a) relataram que em 937 OPU, em 321, animais obtiveram média de 4,2 embriões por vaca, por sessão de OPU. Com taxa média de gestação de 35,4%, obtiveram 1,48 gestações por procedimento. Uma vez que os procedimentos podem ser repetidos semanalmente (FERRAZ *et al.*, 2000), fica claro que a velocidade de multiplicação da prole das doadoras é muito acelerado.

2.2.2. Menor intervalo entre gerações

O intervalo entre gerações é um dos elementos chave em qualquer abordagem sobre melhoramento genético animal (BETTERIDGE *et al.*, 1989). O desenvolvimento de folículos antrais em bezerras desde 2 semanas de idade, o conhecimento das ondas foliculares e a habilidade de superestimular o desenvolvimento folicular nesta categoria de animais, oferece a possibilidade de se utilizar animais pré púberes para a recuperação de oócitos (ADAMS *et al.*, 1994). Tais oócitos têm a mesma competência para produção *in vitro* de embriões (PIV) quando comparados aos obtidos de animais adultos (ARMSTRONG *et al.*,

1994), porém o número de oócitos recuperados em bezerras tende a ser 20% menor (NIBART *et al.*, 1995).

BROGLIATTI & ADAMS (1996), utilizando-se de aspiração folicular guiada por ultra-som, obtiveram êxito na recuperação de oócitos de bezerras a partir de 6 semanas de idade. Desta forma, o intervalo entre gerações fica obviamente diminuído, permitindo uma avaliação precoce do potencial genético destes animais. KATSKA *et al.* (1984) obtiveram resultados semelhantes entre novilhas (18-24 meses) e vacas (9 a 17 anos).

Para exemplificar o ganho genético, podemos avaliar que o método de MOET proporciona um ganho genético para eficiência de crescimento (Growth-efficiency) em gado de corte entre 1,4 a 2,6%. A utilização da aspiração em novilhas pré púberes pode elevar este índice para até 22% (BROGLIATTI & ADAMS, 1996).

2.2.3. Melhor aproveitamento dos animais

Conforme citado no item anterior, as doadoras de oócitos podem ser utilizadas muito precocemente, deste modo, o início de sua vida reprodutiva é muito antecipado. Da mesma forma, estudos realizados com vacas senis (BROGLIATTI & ADAMS, 1996) e vacas prenhes até o 3º mês de gestação (KRUIP *et al.*, 1994 ; NIBART *et al.*, 1995), permitem a produção de embriões pela aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU-FIV). KATSKA *et al.* (1984) observaram que, quanto maior a idade do animal menor a atividade ovariana,

apresentando menor número de folículos a serem aspirados. Assim sendo, as vacas podem produzir descendentes, praticamente desde o seu nascimento até sua senilidade. SAUVÉ (1998) descreveram a utilização do processo de OPU-FIV em bezerras a partir de oito meses, bem como em vacas até o sexto mês de gestação. DAYAN *et al* (1997) também obtiveram gestações de bezerras entre 12 e 14 meses de idade, porém com índices menores do que de vacas adultas. THONON *et al.* (1993) e GUYADER-JOLY *et al.* (2000) observaram que ovários de vacas ciclando, e com corpo lúteo, apresentaram melhores resultados do que vacas gestantes, independente do parâmetro avaliado.

2.2.4. Produtos obtidos de vacas que não respondem à superovulação

Uma vez que a OPU-FIV não requer tratamento hormonal para o seu sucesso, pode-se aproveitar de forma muito mais eficiente animais que não respondem à superovulação, seja por anomalias adquiridas (ausência de resposta ao hormônio) ou por serem refratárias à superovulação. Assim sendo, vacas que possuem grande potencial genético podem ser doadoras de oócitos, não importando mais sua resposta ao hormônio (KRUIP *et al.*, 1994). SAUVÉ (1998) observa que vacas com baixa resposta à SOV respondem completamente diferente das outras, porém não descreve tal variação. No presente trabalho foi observado que vacas de baixa resposta na superovulação, também foram as que produziram menor número de oócitos na OPU.

2.2.5. Produtos obtidos de animais com problemas reprodutivos

Muitos são os casos de alteração da fertilidade por problemas adquiridos. São freqüentes os casos de cistos, aderências de ovário e útero, metrites crônicas, infecções tubárias e outras patologias (LOONEY *et al.*, 1994). A OPU-FIV permite a produção de progênie de animais com tais enfermidades (KRUIP *et al.*, 1994), uma vez que ela não necessita do restante do aparelho reprodutivo, bastando o ovário possuir folículos de tamanho suficiente para a aspiração.

Animais com diferentes graus de salpingite e animais com dificuldade de gestar foram utilizados por PEIXER *et al.* (1998), em um programa de OPU, obtendo 32 embriões e 12 gestações, porém animais com salpingite grave associada a aderências não produziram nenhuma gestação. IGUMA *et al.* (2000) sugerem que oócitos morfológicamente normais podem produzir embriões, mesmo em vacas com cistos crônicos. SENEDA *et al.* (2000) relatam a produção de embriões de uma vaca com obstrução uterina.

2.2.6. Utilização de animais mortos

São freqüentes os casos de pecuaristas que desejam obter mais crias de uma vaca acidentada, enferma ou morta. A remoção dos ovários destes animais pode resultar na recuperação de oócitos viáveis e posterior produção de progênie. Assim sendo, um animal recém morto ou *ante-mortem* ainda pode produzir descendentes. VINCENT & JOHNSON (1992) destacam que a temperatura é um aspecto muito importante, visto que os oócitos são extremamente sensíveis ao

choque térmico. Os autores observaram que a exposição dos oócitos à temperatura de 25°C por apenas 10 minutos pode causar alterações severas no seu citoesqueleto induzindo a formação de *asters* corticais e outras disfunções ooplásmicas.

2.3. Fatores que interferem na produção

A aspiração folicular é uma técnica muito recente, uma vez que o nascimento do primeiro bezerro produzido por fecundação *in vitro* se deu em 1981 (BRACKET *et al.*, 1982) e o primeiro bezerro nascido por OPU - FIV se deu em 1988 (PIETERSE *et al.*, 1988). Assim sendo, a OPU-FIV apresenta resultados muito variáveis quanto ao número de folículos aspirados, ao número de oócitos recuperados, à produção de blastocistos e a taxa de gestação. A seguir, serão expostas algumas causas das variações nos resultados obtidos por diferentes autores.

2.3.1. Doadoras

A variabilidade entre doadoras de oócitos é muito grande, sendo que os animais respondem diferentemente à aspiração folicular (NIBART *et al.*, 1995). Entretanto, o número de oócitos recuperados de um mesmo animal não varia entre as coletas. KRUIP *et al.* (1994), observaram que existe um recrutamento constante de novos folículos quando os presentes são aspirados, porém verificou uma variação individual na velocidade deste recrutamento. WATANABE *et al.*

(1998a) demonstraram que diferentes doadoras apresentam resultados variáveis tanto na produção de oócitos e na qualidade dos mesmos, como na clivagem e no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. DAYAN *et al.* (2000a) apresentaram grande variação na produção de oócitos e de embriões em 20 vacas. Neste estudo a produção de blastocistos variou entre 14 e 54%. Em um mesmo animal, podem ocorrer variações na produção de oócitos totais, viáveis e produção de blastocistos. Fatores como a presença de corpos lúteos podem interferir no resultado, como demonstrou DAYAN *et al.* (1999), onde vacas sem corpo lúteo apresentaram maior número de oócitos em 184 procedimentos.

2.3.2. Raças

O número médio de oócitos coletados é pouco diferente entre as doadoras do tipo leiteiro ou de corte. Entretanto, LOONEY *et al.* (1994) acharam resultados um pouco superiores em vacas de corte. DE ARMAS *et al.* (1994) observaram que vacas holandesas produziram média de 6,8 oócitos por OPU, enquanto vacas zebuínas produziram 5,1. Observaram também que a produção de embriões foi superior nas holandesas (27,5% e 22,4%, respectivamente). Os animais cruzados entre as duas raças apresentaram 5,8 oócitos por OPU e 54,1% de produção de embriões. DOMINGUEZ (1995) constataram que vacas de origem européia apresentaram maior quantidade de folículos grandes ($\geq 10\text{mm}$) e que, quanto maior o folículo, pior a qualidade dos oócitos obtidos. DAYAN *et al.* (2000b), por outro lado, trabalhando com 3.563 oócitos viáveis de diferentes raças, oriundos de 372 procedimentos de OPU, obtiveram resultados semelhantes entre as raças

estudadas, quanto ao número médio de oócitos viáveis, blastocistos e taxa de gestação para raças taurinas (9,1; 2,8 e 34%, respectivamente) e raças zebuínas (9,7; 2,8 e 32%, respectivamente).

2.3.3. Touros

A utilização de sêmen congelado de diferentes touros demonstrou que este possui importante papel no resultado final do processo de OPU-FIV. Assim sendo, a fertilidade dos touros é variável tanto a campo, como na produção *in vitro* de embriões (WATANABE *et al.*, 1995). Em 1992, MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, também observaram uma alta correlação entre a produção de blastocistos e a fertilidade a campo de diferentes touros.

KRUIP *et al.* (1994) relataram que uma vaca de 12 anos acasalada com 8 touros diferentes, obteve embriões apenas de 4 destes, com produção de embriões entre 9 e 19%. WATANABE *et al.* (1998b) obtiveram variações entre 38 e 91% na clivagem e entre 16 e 50% na produção de embriões, utilizando 12 reprodutores da raça Nelore. DAYAN *et al.* (2000a) verificaram que além da variação do touro, também existe um efeito resultante da interação entre o touro e a vaca, onde um mesmo touro apresentou variações na produção de embriões e de gestações, quando acasalado com diferentes vacas. SAUVÉ (1998) sugere a execução de um teste para avaliar cada partida de sêmen dos diferentes touros utilizados, uma vez que os resultados apresentam grande variação tanto entre animais, como entre partidas.

2.3.4. Freqüência de aspiração

A taxa de recuperação de oócitos imaturos aumenta se a coleta for repetida no mesmo animal por um período de vários meses (KRUIP *et al.*, 1994). A aspiração repetida 2 vezes por semana, quando comparada a uma vez por semana, produz um aumento considerável no número de folículos visíveis (16,2 e 7,0, respectivamente) e de oócitos recuperados (12,2 e 5,2, respectivamente) (REICHEMBACH *et al.*, 1994). GIBBONS *et al.* (1994) também obtiveram maior número de embriões transferíveis em aspirações realizadas 2 vezes por semana. FERRAZ *et al.* (2000) relataram que o primeiro procedimento de OPU apresenta melhores resultados, igualando-se apenas a intervalos superiores a 60 dias, porém, a OPU semanal ou quinzenal mantém médias entre 7 e 9 oócitos de boa qualidade, por procedimento.

HASLER *et al.* (1995) demonstraram que o número de oócitos produzidos caiu consideravelmente após 50 sessões de aspiração em um mesmo animal.

2.3.5. Equipamento utilizado para OPU

NIBART *et al.* (1995) apresentaram uma revisão demonstrando que, qualquer que seja o sistema de visualização e de punção folicular utilizado, os resultados em termos de oócitos coletados são semelhantes.

HILL *et al.* (1995) realizaram aspiração folicular sem o auxílio de ultra-som, utilizando-se apenas da palpação retal e obtiveram média de 6,2 oócitos recuperados por doadora.

BROGLIATTI & ADAMS (1996) destacaram a importância de aspectos como espessura da agulha, fio de corte do bisel, forma do bisel e pressão de vácuo, que podem alterar a eficiência de recuperação. O aumento da pressão de aspiração em humanos demonstrou uma maior taxa de recuperação, porém uma diminuição na qualidade dos oócitos, além de aumentar o número de oócitos sem *cumulus oophorus*. Convém citar que a presença de células do *cumulus* são importantes para aumentar a taxa de desenvolvimento de oócitos maturados e fecundados *in vitro* (KONISHI *et al.*, 1996).

BOLS *et al.* 1995 obtiveram maior taxa de recuperação por folículo aspirado usando agulhas descartáveis, sendo que as mais espessas proporcionaram maior recuperação. Outro estudo (BOLS *et al.* 1996) demonstrou que a pressão é muito importante na qualidade dos oócitos. Houve um maior número de oócitos recuperados com o aumento da pressão de vácuo, porém diminuiu a quantidade de células do *cumulus*, independente do calibre da agulha.

Agulhas mais finas apresentaram melhor qualidade do complexo *cumullus oophorus* (COC) com células mais compactas.

2.3.6. Variações entre operadores

O operador pode determinar grandes variações no número de folículos aspirados, bem como no número de oócitos recuperados. Esta variação ocorre entre operadores, da mesma forma como, entre sessões com o mesmo operador (NIBART *et al.*, 1995). LANSBERGEN *et al.* (1995) descrevem que houve variações significativas entre veterinários na taxa de recuperação. Sua equipe era formada por 5 veterinários operando em duas estações experimentais. Com sucessivas trocas das equipes foi comprovada que a maior variação ocorre devido a doadora e, o segundo fator mais importante é o operador. AZAMBUJA *et al.* (1997) observaram que, após 90 dias de treinamento, um técnico inexperiente obteve 91,1% de melhora na recuperação de oócitos.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistem na avaliação dos diversos fatores que podem estar envolvidos na rotina da produção *in vitro* de embriões.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a influência da raça das doadoras quanto à quantidade e qualidade dos oócitos, assim como a produção de embriões por OPU-FIV;
- b) Avaliar a influência da sazonalidade na recuperação de oócitos e a capacidade de produzir embriões viáveis para transferência;
- c) Verificar a influência da sincronização da receptora no momento da transferência embrionária;
- d) Avaliar a influência do estágio de desenvolvimento no momento da transferência;
- e) Avaliar a interação entre o estágio de desenvolvimento embrionário e a sincronização das receptoras.

4. MATERIAL E MÉTODO

O processo de aspiração folicular foi realizado em propriedades de pecuaristas de gado de elite, interessados em incrementar sua produção de vacas de importante valor genético. A produção *in vitro* dos embriões contou com duas equipes de trabalho, sendo uma a campo e outra no laboratório. O trabalho a campo foi realizado pelo veterinário que procedeu a OPU, contando sempre com a ajuda de um técnico que fazia a filtragem, a seleção, classificação e lavagem dos oócitos nas fazendas. O transporte rodoviário foi efetuado em distâncias variando entre 40 e 500 km do laboratório e o aéreo para distâncias superiores. O processo de maturação, fecundação e cultivo dos embriões foi efetuado pela equipe do laboratório da Vitrogen®, na cidade de Cravinhos-SP.

4.1. Doadoras de oócitos

Foram avaliadas 1.841 aspirações foliculares em 566 vacas doadoras, de 8 raças em 29 propriedades, nos estados de SP, PR e MG. A idade dos animais variou entre 12 e 240 meses, gestantes ou não, sob diferentes formas de manejo e sem nenhum tipo de tratamento hormonal. Não foi considerada a fertilidade dos animais, nem tão pouco a ciclicidade dos mesmos. O quadro 01 apresenta a distribuição dos animais por raça, fazendas e número de procedimentos realizados.

Quadro 01: Distribuição dos animais por raça, por fazenda e número de procedimentos realizados por raça

Raça	Animais	Fazendas	Procedimentos
Blond D'Aquitaine	17	3	40
Brahman	10	1	110
Gir	8	2	19
Guzerá	19	1	57
Holandesa	10	1	39
Limousin	45	7	127
Nelore	448	24	1.393
Pardo Suiço Corte	9	2	56
Total	566	29	1.841

4.2. *Aspiração folicular*

Após a contenção da doadora no brete, foi efetuada anestesia epidural baixa com 5 ml de cloridrato de lidocaina a 2% (KRUIP *et al.*, 1994), sendo, em seguida, lavada a região perineal apenas com água.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultra-som Aloka SSD 500 com transdutor microconvexo de 5 mHz (UST 974-5) conectado a uma guia de biópsia adaptada por Chuck Bolland. As aspirações foram realizadas com agulhas 18G, (Cook VBOAS 1855) e linha de aspiração (Cook VBOA 18L) em tubos de centrífuga de 50ml. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba Cook V-MAR 5000, ajustada entre 72 e 78 mm Hg.

Imediatamente após a anestesia epidural, o transdutor foi inserido até o fundo de saco vaginal e, com o auxílio da manipulação retal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visualização na tela do ultra-som. Os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da linha de punção indicada na tela do ultra-som. Uma vez que a agulha estivesse próxima ao folículo a ser aspirado, o pedal de acionamento do vácuo era pressionado e o folículo aspirado (NIBART *et al.*, 1995).

Foram aspirados todos os folículos visíveis de cada ovário, sendo estes maiores de 2mm. A lavagem da agulha e o meio de recebimento dos oócitos foi efetuado com PBS (Nutricell) acrescido de 5,0 UI/ml de Heparina (Liquemine®), 50 mg/ml de Gentamicina (Gentocin®) e 1% de soro fetal bovino (SFB Nutricell).

4.3. Lavagem, seleção e transporte

Ao chegar no laboratório da fazenda, onde se procedia a aspiração, o tubo contendo o aspirado foi despejado em filtro de coleta de embriões (EmCom®), e lavado com a mesma solução utilizada na lavagem da agulha. O sedimento restante no filtro foi então observado em placas de *petri* e, neste momento

efetuada a contagem e a avaliação dos oócitos quanto a qualidade. Os oócitos foram classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em Grau I,II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo LONERGAN *et al* (1992).

Após a classificação, foram lavados em solução de TCM 199 (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco), transportados em criotubos (Corning) com a mesma solução em banho maria, entre 30 e 34°C. O tempo médio de transporte variou entre 3 e 8 horas, com média de 5 horas do início da aspiração da primeira vaca até a chegada ao laboratório.

4.4. Maturação *in vitro*

Os oócitos obtidos foram selecionados de acordo com o seu grau de qualidade, sendo utilizados oócitos com ou sem células do *cumulus*, mas de aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneo. Foram descartados oócitos atrésicos e degenerados. Após a seleção, os oócitos foram transferidos para as placas de maturação *in vitro* em microgotas do meio TCM 199 suplementado com 10% SFB, 5µg/ml FSH, 50µg/ml LH e 01µg/ml de estradiol cobertas com óleo mineral de acordo com o protocolo de WATANABE *et al.* (1998a,b). Os oócitos permaneceram incubados por 24 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.5. Fecundação *in vitro*

Para a fecundação *in vitro* foram utilizadas amostras de sêmen congelado das diferentes raças, preparadas mediante a técnica de gradiente de Percoll para obtenção de espermatozóides móveis, remoção do diluidor e plasma seminal. A concentração foi ajustada para 2×10^6 sptz/ml. O meio utilizado na fecundação *in vitro* foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e $10 \mu\text{g/ml}$ de heparina. Os gametas permaneceram incubados em microgotas recobertas com óleo mineral, por 18-20 horas a $38,5^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 em ar.

4.6. Cultivo *in vitro*

Após o tempo de incubação dos gametas, as estruturas foram transferidas para as microgotas de meio de cultivo (CR2 modificado, suplementado com 10% de SFB), permanecendo nestas por um período de 6 a 8 dias (C6 a C8) até os zigotos atingirem os estádios de mórula (Mo) e blastocisto (BI). Foram adicionados $30 \mu\text{l}$ do meio de cultivo fresco às 48 horas pós inseminação (*feeding*).

4.7. Transferência dos embriões

Foram transferidos 3.572 embriões oriundos das 1.841 aspirações foliculares. As transferências foram realizadas pela técnica transcervical, sendo que, em cada fazenda, a transferência foi realizada por um técnico diferente.

O procedimento consiste em conter o animal em brete próprio, sendo efetuada uma anestesia epidural baixa com 5ml de cloridrato de lidocaina a 2%. Foi efetuada uma assepsia perineal e, em seguida, introduzido o inovulador, ultrapassando a cérvix, para deposição do embrião profundamente no útero, no corno correspondente ao ovário que contém o corpo lúteo.

Foram utilizadas receptoras entre o quinto e o nono dia após o cio.

Para o presente trabalho foram consideradas apenas as transferências de um único embrião até oito dias de cultivo (C8). Foram excluídas as transferências que não ultrapassaram a cérvix, transferências em receptoras após o 9º dia do cio (D9), transferências de embriões congelados e transferências em receptoras sem corpo lúteo. Foram apenas consideradas as transferências com diagnóstico definitivo, efetuado após 30 dias de gestação.

O tempo médio de transporte dos embriões foi de 5 horas, contadas da saída dos embriões do laboratório, até a implantação na receptora.

4.8. Análise Estatística

1. Para comparar as variáveis foi utilizado o teste de qui quadrado, (χ^2) mediante procedimento do programa de computador JMP versão 2.4 – SAS Institut (Carry, NC, EUA).

5. Resultados

Foram realizados 1.841 procedimentos de aspiração folicular em 566 animais durante 29 meses. Neste período foi recuperado um total de 26.308 oócitos ($x=14,29$), dos quais 19.659 ($x=10,68$) considerados viáveis (GI, GII e GIII), resultando em 7.116 embriões (36,20%). Destes, foram transferidos 3.572 que resultaram em 1.147 gestações (32,11%).

5.1. Influência da raça na quantidade e qualidade dos oócitos e dos embriões obtidos por aspiração folicular.

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que as raças que apresentaram maior número de oócitos recuperados foram Nelore e Blond D'Aquitaine ($15,52\pm 3,15$ e $14,85\pm 2,40$, respectivamente), por outro lado as

raças Pardo Suíço e Gir produziram $3,39\pm 1,58$ e $4,84\pm 3,55$, respectivamente. A produção de oócitos viáveis acompanhou a produção geral, porém a produção de embriões foi melhor nas raças Brahman e Blond D'Aquitaine e Nelore ($5,54\pm 2,36$; $4,43\pm 1,92$; $4,04\pm 2,47$, respectivamente). Na Tabela 1, estão resumidos os resultados totais e médios dos oócitos recuperados, oócitos viáveis e a produção de embriões por raça.

Tabela 1 - Produção total de oócitos, oócitos viáveis, embriões e suas respectivas médias, nas diferentes raças bovinas.

Raça	Tot. Oóc	(x)	Oóc. Viáv.	(x)	Embs.	(x)
Blond	594	$14,85\pm 2,40^{ab}$	446	$11,15\pm 2,25^{ab}$	177	$4,43\pm 1,92^{ab}$
Brahman	1.395	$12,68\pm 3,07^{bc}$	1.057	$9,61\pm 2,87^{abc}$	609	$5,54\pm 2,36^a$
Gir	92	$4,84\pm 3,55^{de}$	72	$3,79\pm 3,16^{de}$	15	$0,79\pm 1,33^{de}$
Guzerá	594	$10,42\pm 2,33^{bcd}$	485	$8,51\pm 2,15^{bcd}$	145	$2,54\pm 1,88^{cd}$
Holandesa	312	$8,00\pm 1,64^{cde}$	248	$6,36\pm 1,49^{cde}$	59	$1,51\pm 1,43^{de}$
Limousin	1.510	$11,89\pm 2,17^{bc}$	1.105	$8,70\pm 2,04^{bcd}$	453	$3,57\pm 2,10^{bc}$
Nelore	2.1621	$15,52\pm 3,56^a$	16.102	$11,56\pm 3,27^a$	5.625	$4,04\pm 2,47^b$
Pardo Suíço	190	$3,39\pm 1,58^e$	144	$2,57\pm 1,42^e$	33	$0,59\pm 1,82^e$
Total	26.308	14,29	19.659	10,68	7.116	3,87

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$)

5.2. Influência da estação do ano na quantidade e qualidade dos oócitos e dos embriões obtidos por aspiração folicular.

As aspirações foliculares consecutivas, no decorrer de 29 meses, demonstraram que no inverno a produção de oócitos manteve-se superior às outras estações, sendo significativamente superior em relação ao outono, quer

seja no número total de oócitos ($15,22\pm 3,62$ e $13,36\pm 3,48$, respectivamente), quer seja na quantidade de oócitos viáveis ($11,51\pm 2,36$ e $9,77\pm 3,08$, respectivamente).

Os dados referentes às outras estações mantiveram-se semelhantes no que diz respeito aos oócitos recuperados totais e viáveis, conforme os dados demonstrados na Tabela 2..

A produção de embriões, por outro lado, apresentou-se inferior no inverno ($3,46\pm 2,31$), independente da estação comparada, apresentando diferença significativa quando comparada ao outono ($4,14\pm 2,49$) e ao verão ($4,35\pm 2,38$).

A Tabela 2 apresenta ainda a variação na produção de embriões e suas respectivas médias, nas diferentes estações do ano.

Tabela 2 - Variação na produção total e médias de oócitos recuperados, viáveis e produção de embriões, nas diferentes estações do ano (V=verão; O=outono; P=primavera e I=inverno)

Estação	N	Total Oócitos	(x)	Oócitos Viáveis	(x)	Embriões	(x)
V	272	3.789	$13,93\pm 3,13^{a,b}$	2.876	$10,57\pm 2,87^{a,b}$	1.182	$4,35\pm 2,38^a$
O	454	6.064	$13,36\pm 3,48^b$	4.437	$9,77\pm 3,08^b$	1.880	$4,14\pm 2,49^a$
P	539	7.687	$14,26\pm 3,44^{a,b}$	5.715	$10,60\pm 3,15^{a,b}$	2.063	$3,83\pm 2,54^{a,b}$
I	576	8.768	$15,22\pm 3,62^a$	6.631	$11,51\pm 2,36^a$	1.991	$3,46\pm 2,31^b$
Total	1.841	26.308	14,29	19.659	10,68	7.116	3,87

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$)

5.3. Influência da estação do ano em relação à taxa de gestação após a transferência dos embriões

A variação nas estações, reflete significativamente na taxa de gestação ($P < 0,01$) no decorrer do ano, apresentando melhor taxa de gestação no verão e no outono ($36,26 \pm 0,80$ e $35,16 \pm 0,80$, respectivamente), quando comparadas com o primavera e inverno ($29,21 \pm 0,84$ e $27,18 \pm 0,85$, respectivamente). O verão e o outono não apresentaram diferença, nem tampouco o inverno e a primavera. Na Tabela 3 pode-se observar os resultados obtidos das transferências nas diferentes estações do ano e a taxa de gestação obtida.

Tabela 3 – Taxa de gestação de embriões bovinos produzidos *in vitro* transferidos em diferentes estações do ano (V=verão; O=outono; P=primavera e I=inverno)

Estação	TE	Prenhes	%
V	1.048	380	36,26% ($\pm 0,80$) ^a
O	765	269	35,16% ($\pm 0,80$) ^a
P	979	286	29,21% ($\pm 0,84$) ^b
I	780	212	27,18% ($\pm 0,85$) ^b
Total	3.572	1.147	32,11%

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,01$)

5.4. Influência da sincronização da receptora na taxa de gestação

A avaliação da influência da sincronização da receptora, independente do tempo de cultivo e estágio embrionário no momento da transferência, demonstrou que as receptoras transferidas no quinto e no sexto dia após o cio (D5 e D6), apresentaram taxa de gestação significativamente inferior ($15,48\% \pm 0,92$ e $27,67\% \pm 0,85$, respectivamente, $P < 0,01$), quando comparadas às receptoras transferidas em D7, D8 e D9 ($38,01\% \pm 0,79$; $38,01\% \pm 0,79$; $38,78\% \pm 0,79$, respectivamente), as quais não diferiram entre si.

A Tabela 4 apresenta a variação da sincronização da receptora no momento da transferência com a taxa de gestação.

Tabela 4 - Influência da sincronização da receptora no momento da transferência na taxa de gestação.

Sincronização	Embriões	Nº	%
Receptora	Transferidos	Prenhes	Gestação
D5	420	65	$15,48\% (\pm 0,92)^c$
D6	1.131	313	$27,67\% (\pm 0,85)^b$
D7	1.339	509	$38,01\% (\pm 0,79)^a$
D8	584	222	$38,01\% (\pm 0,79)^a$
D9	98	38	$38,78\% (\pm 0,79)^a$
Total	3.572	1.147	32,11%

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,01$)

5.5. Influência do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de gestação.

Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário no ato da transferência, independente do tempo de cultivo e da sincronização da receptora, foi observado que os embriões em estádios mais avançados apresentaram melhor taxa de gestação, quando comparados com embriões de desenvolvimento inferior ($P < 0,05$). Na Tabela 5, pode-se observar que as mórulas (Mo) apresentaram taxa de gestação inferior ($17,31\% \pm 0,76$) quando comparadas com Bi, B1, Bx e Be ($25,59\% \pm 0,86$; $32,01\% \pm 0,82$; $39,42\% \pm 0,86$; $43,90\% \pm 0,77$, respectivamente). Os blastocistos que apresentaram regressão (Br) no decorrer de cultivo, apresentaram taxa de gestação inferior ($28,57\% \pm 0,91$), no entanto os dados não apresentaram diferença significativa.

Tabela 5 – Taxa de gestação após transferência de embriões produzidos *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento (Mo=mórula; Bi=blastocisto inicial; Bl=blastocisto propriamente dito; Bx=blastocisto expandido e Be=blastocisto em eclosão).

Estádio de Desenvolvimento	Embriões transferidos	Gestações	% Gestação
Mo	468	81	17,31% ($\pm 0,76$) ^d
Bi	637	163	25,59% ($\pm 0,86$) ^c
Bl	931	298	32,01% ($\pm 0,82$) ^b
Bx	1474	581	39,42% ($\pm 0,86$) ^a
Be	41	18	43,90% ($\pm 0,77$) ^a
Br	21	6	28,57% ($\pm 0,91$) ^{a,b,c,d}
Total	3.572	1.147	32,11%

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$)

Quando avaliou-se a taxa de gestação nos vários estádios de desenvolvimento embrionário, obtidos em diferentes tempos de cultivo, ou seja, após 6, 7 ou 8 dias em cultivo *in vitro* (C6, C7 e C8, respectivamente), observou-se que embriões com rápido desenvolvimento são significativamente superiores ($P < 0,05$) aos embriões de desenvolvimento mais lento. No Gráfico 01 podemos observar as diferentes taxas de gestação para os diferentes tempos de cultivo, associados à cinética do desenvolvimento.

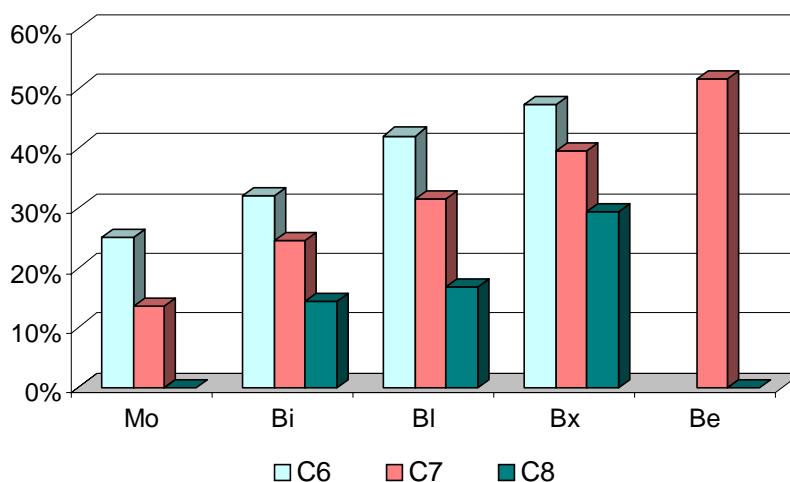


Gráfico 01 – Taxa de gestação após transferência de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário (Mo=mórula; Bi=blastocisto inicial; Bl=blastocisto propriamente dito; Bx=blastocisto expandido e Be=blastocisto em eclosão), associado ao tempo de cultivo (C6=6 dias; C7=7 dias C8=8 dias).

5.6. Interação ente o estágio embrionário e a sincronização das receptoras

Ao verificar a interação entre o estágio de desenvolvimento embrionário em relação a sincronização das receptoras, observou-se que no sétimo dia de cultivo (C7), Mo e Bl apresentaram melhor taxa de gestação, quando transferidos em receptoras com sincronização D6, D7 e D8, embora não haja diferença estatística.

Porém, embriões em estádios de Bl e Bx apresentaram melhores ($P < 0,05$) resultados em receptoras D7 e D8.

Conforme os dados apresentados na Tabela 6 pode-se verificar a importância da interação entre a sincronização da receptora e o estágio de desenvolvimento embrionário.

Tabela 6 - Efeito da sincronização da receptora e do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de gestação. (Mo=mórula; Bi=blastocisto inicial; BI=blastocisto propriamente dito; Bx=blastocisto expandido e Be=blastocisto em eclosão).

Estádio Sincro	Mo % P	Bi % P	BI % P	Bx % P	Be % P
D5	6,93%(±0,97) ^b	19,38%(±0,90) ^b	17,48%(±0,91) ^b	18,07%(±0,91) ^d	0,00% ^b
D6	19,87%(±0,90) ^{a,b}	24,65%(±0,87) ^{a,b}	31,19%(±0,83) ^a	28,73%(±0,84) ^c	50,00%(±0,76) ^a
D7	20,78%(±0,89) ^a	31,13%(±0,83) ^a	36,12%(±0,80) ^a	45,29%(±0,74) ^b	62,50%(±0,63) ^a
D8	23,81%(±0,88) ^a	23,61%(±0,88) ^a	38,37%(±0,79) ^a	42,32%(±0,76) ^b	36,36%(±0,84) ^a
D9	6,67%(±1,00) ^{a,b}	22,22%(±0,93) ^a	26,32%(±0,88) ^{a,b}	57,14%(±0,66) ^a	0,00% ^{a,b}
Total	17,31% (±0,76)	25,59% (±0,86)	32,01% (±0,82)	39,42 (±0,86)	43,90% (±0,77)

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,01)

6. Discussão

Considerando o grande número de procedimentos realizados, os resultados gerais indicam enorme possibilidade de multiplicação de animais de alto valor genético aplicando-se as técnicas de OPU-FIV. Calculando-se que, se a taxa média de gestação (32,11%) fosse aplicada a todos os embriões produzidos, seriam totalizadas 2.285 gestações o que resultaria em uma média de 1,24 prenheses por procedimento de OPU. A possibilidade de seleção, por ultrasonografia, das matrizes de melhor produção de oócitos e a escolha dos touros de melhor resultado na PIV poderia incrementar ainda mais a velocidade de produção pelo processo (DAYAN *et al.* 2000a,b). Com a utilização das observações do presente trabalho, isto é, a aplicação da técnica no verão, a transferência dos embriões de desenvolvimento mais rápido e a adequada

sincronização das receptoras, podemos melhorar ainda mais a velocidade de produção mediante a OPU-FIV.

Os dados obtidos nas diferentes raças demonstraram claramente que a técnica é factível de êxito em todas elas, uma vez que foram obtidos embriões em todas as raças testadas. Conforme descrito na literatura (KRUIP *et al.*, 1994; NIBART *et al.*, 1995; WATANABE *et al.* 1998a e DAYAN *et al.* 2000a,b), a variação individual foi o fator mais relevante na produção *in vitro* de embriões.

As raças que apresentaram menor produção de embriões (Holandesa, Gir e Pardo Suíço) foram as que sofreram um menor número de intervenções, onde todos os animais trabalhados possuíam algum problema reprodutivo adquirido. Dentre estes, podemos citar: dificuldade de emprenhar, baixa resposta a superovulação, presença de cistos ovarianos, bem como animais de idade avançada (senis). Estes fatores sugerem que novos trabalhos devem ser efetuados para aferir a resposta destas raças específicas.

Dentre os animais que apresentaram maior número de repetições, temos a raça Brahman, Blond D'Aquitaine e Nelore como maiores produtoras de oócitos e de embriões no processo de OPU-FIV. Os números obtidos nestas raças demonstram que o processo pode ser aplicado como uma técnica alternativa para multiplicação do rebanho, uma vez que produzirão mais de uma gestação (1,34) por sessão de OPU, podendo esta, ser repetida semanalmente. Estes resultados concordam com os obtidos anteriormente por NIBART *et al.* (1995) e WATANABE *et al.* (2001).

A taxa de recuperação de oócitos no inverno foi semelhante às outras estações do ano com médias numericamente superiores. Era suposto que fatores

como o fotoperíodo, nutrição e temperatura influenciariam a quantidade e a morfologia dos oócitos recuperados, uma vez que estes fatores interferem no metabolismo animal. Os resultados apresentados demonstram que não houve tal interferência.

Neste trabalho não foi avaliada a variação nas estações do ano por raça, pois a amostragem não foi suficiente. É interessante ressaltar que as raças zebuínas poderiam ser mais afetadas na produção de oócitos pelas estações frias, uma vez que são de origem tropical; porém os resultados obtidos apresentaram maior produção de oócitos no inverno, inclusive nos animais de origem zebuína, demonstrando que não houve interferência do clima na quantidade de oócitos destes animais.

Por outro lado, a diminuição no resultado final da produção de embriões no inverno pode ser atribuída a fatores como a temperatura externa, no momento das aspirações e da manipulação dos oócitos na fazenda. Tal fato não demonstra alterações evidentes na morfologia macroscópica dos oócitos, porém é de se esperar alterações na ultra-estrutura destes, uma vez que pequenas exposições em ambientes frios, pode causar alteração no citoesqueleto dos oócitos (VINCENT & JOHNSON, 1992). É importante ressaltar que, após sua retirada do folículo, os oócitos iniciam sua maturação com a retomada da meiose onde, danos microscópicos podem ocorrer e interferir na produção de embriões e na taxa de gestação. Outra causa possível pode ser o transporte que, entre a fazenda e o laboratório pode sofrer variações de temperatura, ocasionando prejuízos no processo de maturação dos oócitos. De acordo com POLLARD *et al.*

(1996), tanto a temperatura de coleta, como de transporte podem interferir significativamente na taxa de clivagem e produção de blastocistos.

É interessante notar que as médias de produção de blastocisto foram superiores no verão e outono (coincidentemente com a melhor taxa de gestação), indicando que fatores como o transporte são fundamentais na produção de embriões viáveis.

Embora a produção de oócitos seja maior no inverno, o resultado dos embriões transferidos no inverno e na primavera foi inferior ao restante do ano. Muitos dos embriões produzidos não foram transferidos por falta de receptoras, uma vez que a ciclicidade destas é muito influenciada pelas alterações climáticas no decorrer do ano, fato que pode também reduzir a fertilidade da receptora. A temperatura de exposição dos embriões na retirada dos mesmos da estufa, bem como durante o envase, transporte e transferência também podem ser agravantes na redução de gestações obtidas.

Outros fatores inerentes à receptora também devem ser considerados. É sabido que no frio as receptoras manifestam menor número de cios, o alimento fica menos disponível e o fotoperíodo reduzido. Assim sendo, a resposta a prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) é diminuída, bem como a qualidade dos corpos lúteos no ato da transferência embrionária. Deste modo, a soma deste fatores podem ser determinantes nos resultados obtidos neste período.

Ao observar o estágio de desenvolvimento embrionário, independente do tempo de cultivo e da sincronização da receptora, nota-se que, quanto mais avançado o estágio embrionário maior é a taxa de gestação. Este fato leva a crer que: quanto mais tempo o embrião ficar em cultivo até atingir os estádios mais

avançados, maior o número de gestações. Por outro lado, ao observar-se a taxa de gestação, isoladamente por tempo de cultivo, notamos que tanto em D6, como D7 e D8, sempre os estádios mais avançados foram os que resultaram em maior taxa de gestação. Isso nos sugere que quanto maior a velocidade de desenvolvimento dos embriões, maior será a taxa de gestação.

Conforme os resultados preliminares observados por Watanabe e Meirelles (dados não publicados), blastocistos expandidos oriundos de embriões de desenvolvimento rápido tendem a passar por um número de ciclos celulares significativamente superior do que os de desenvolvimento lento ($6,18 \pm 0,05$; $5,84 \pm 0,11$, respectivamente $P < 0,01$). Além disso, os autores observaram que os embriões obtidos do grupo de desenvolvimento rápido apresentou blastômeros com maior número de núcleos normais, sendo que o grupo de desenvolvimento lento apresentou núcleos picnóticos.

Outros estudos estão sendo realizados para determinar se a velocidade de desenvolvimento também está relacionada com o sexo do embrião, uma vez que AVERY *et al.* (1991) obtiveram 98,5% dos embriões de desenvolvimento mais rápido, do sexo masculino.

Quanto ao tempo de cultivo, notou-se que em C8 a taxa de gestação cai significativamente, desta forma não convém aguardar mais um dia em cultivo para posterior transferência.

Ao observar a sincronização da receptora com a taxa de gestação, nota-se que sincronizações D7, D8 e D9 apresentaram melhores resultados.

Sincronizações negativas como D5 e D6 foram amplamente utilizadas neste trabalho, justamente porque acreditava-se que receptoras com sincronismo

negativo apresentariam os mesmos resultados quanto a taxa de gestação, como observado em embriões de MOET (ZANENGA, comunicação oral). Assim sendo, era suposto que, quanto antes fosse transferido o embrião, haveria maior tempo para que o embrião se recuperasse de eventuais danos causados pelo processo em seu ambiente natural e sinalizasse a gestação. Sincronizações como D8 e D9 poderiam reduzir o tempo para a sinalização do embrião no que diz respeito ao reconhecimento materno da gestação, por outro lado é sabido que os embriões produzidos *in vitro* possuem desenvolvimento mais rápido do que os embriões *in vivo* (AVERY *et al.* 1991). Desta forma fica descartada a hipótese de que o reconhecimento materno pode ser afetado em uma transferência até D9 e que, as condições uterinas estão mais favoráveis após o sexto dia, favorecendo a implantação do embrião produzido *in vitro*.

Ao avaliar a interação do estágio embrionário e a sincronização da receptora mediante a taxa de gestação, foi observada maior taxa de gestação, quando somaram-se o estágio de desenvolvimento mais adiantado, com a sincronização D7 ou próximo a esta. Deste modo sugerimos a transferência de blastocistos expandidos em receptoras D7 e D8, bem como mórulas e blastocistos iniciais em receptoras D6 e D7. As taxas de gestação em receptoras D5 foram inferiores, demonstrando que cinco dias após o cio, o útero das receptoras apresenta condições desfavoráveis à implantação embrionária.

Outro aspecto de deve ser considerado é a possível alteração na saúde da doadora mediante um programa intensivo de OPU. No presente trabalho foi verificado que, de uma forma geral, não foram observadas alterações no estado geral, nem tampouco no trato reprodutivo das doadoras, mesmo após uma longa

seqüência de aspirações foliculares. Não foram observados casos de aderência, nem outras alterações reprodutivas importantes. Na propriedade, onde houve o maior número de repetições em Brahman (n=127) e Nelore (n=169), os animais que sofreram grande número de intervenções apresentaram maior rigidez ovariana no momento de introdução da agulha, provavelmente ocasionada por fibrose, porém não houve alteração na produção de oócitos nem de embriões. Em ovários que possuíam folículos grandes ou cistos, foi observada, eventualmente, a formação de corpos ecogênicos na semana subsequente à OPU, podendo representar coágulos intrafoliculares. São necessários mais estudos histológicos para determinar a extensão das lesões ovarianas.

Finalmente, para o incremento da taxa de gestação de embriões produzidos *in vitro*, é necessário adequar a cinética do desenvolvimento embrionário com a sincronização da receptora. Além disso, é importante ressaltar que em determinadas estações do ano a técnica de aspiração folicular e fecundação *in vitro* pode ser aplicada com maior sucesso.

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Quanto à raça, observamos que houve diferença entre os grupos estudados onde as raças Brahman, Blond D'Aquitaine, Nelore e Limousin obtiveram maior produção de embriões, porém os dados relativos às outras raças não são conclusivos. Novos estudos devem ser realizados afim de averiguar a resposta destas raças específicas.

- A estação do ano influenciou significativamente na produção *in vitro* de embriões onde, no inverno, a produção de oócitos foi superior, porém a produção de embriões foi inferior às demais estações.

- Os resultados obtidos apresentaram-se superiores no verão e outono, quando comparados à primavera e ao inverno, no que diz respeito à taxa de gestação.
- Quanto ao tempo de cultivo, observamos que houve maior taxa de gestação nos embriões mais desenvolvidos, independente do tempo de cultivo.
- A sincronização da receptora apresentou resultados significativamente superiores quanto a taxa de gestação para D7, D8 e D9, ou seja, o sétimo, oitavo e nono dia após o cio.
- Associando-se o estágio embrionário com a sincronização da receptora, podemos concluir que os estádios de desenvolvimento mais adiantados em C6 e C7 apresentaram resultados superiores quando transferidos para receptoras D7 e D8.
- A técnica apresentou-se eficiente para multiplicação rápida de rebanhos de alto valor genético.

8. Referências Bibliográficas

ADAMS, G.P., EVANS, A.C.O., RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **J. Reprod. Fertil.** v.100 p.27-33 1994.

ARMSTRONG, D. T.; IRVINE, B. EARL, C. R. McLEAN, D. SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**. v.42 p.1227-1236 1994.

AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine *in vitro* fertilized embryos. **Theriogenology** v.35, p.953-963, 1991.

AZAMBUJA, R.M.; WATANABE, M.R.; LÔBO, R.B. Efeito da experiência do veterinário na aspiração *in vivo* de oócitos de vacas zebuínas através da ultrassonografia. Resultados preliminares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.70-171, 1997.

BETTERIDGE, K. J., SMITH, C. STUBBINGS R. B. XY, K. P. KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** v.38 p.87-98, 1989.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: New disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, p.677, 1995.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Effects of aspiration cavuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.1001-1014, 1996.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONARVICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.**, v.27, p.147-158, 1982.

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

DAYAN, A.; FIRMINO, F.A.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. GARCIA, J.M. Aspiração folicular em novílias nelore pré púberes e produção *in vitro* de embriões (resultados preliminares). **Ciência Animal**, v.7, n.2, p.107, 1997.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; LÔBO, R.B.; FRANCESCHINI, P.H. WATANABE, Y.F. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças zebuínas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, n.1, p.226, 1999.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.181-185, 2000a.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; MEIRELLES, F.V.; LÔBO, R.B.; WATANABE, Y.F. *Bos indicus* and *Bos taurus in vitro* produced embryos develop similarly in tropical conditions. **Theriogenology**, v.53, p.348, 2000b.

DE ARMAS, R.; SOLANO, R.; PUPO, C.A.; AGUILAR, A.; AGUIRRE, A. RIEGO, E.; CASTRO, F.O. Effect of the donor oocyte breed on *in vitro* fertilization results in cattle. **Theriogenology**, v.41, p.186, 1994.

DOMINGUEZ, M.M. Effect of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v.43, p.1405-1408, 1995.

ERICKSON, B. H., Development and senescence of postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.** v.25, p.800, 1966.

FERRAZ, M.L.; DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Influência da frequência de OPU-FIV em bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.251, 2000.

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

GUYADER-JOLY, C.; DURAND, M.; MOREL, A.; PONCHON, S.; MARQUANT, L.B. GUÉRIN, B. HUMBLLOT, P. Sources of variation in blastocyst production in a commercial ovum pick-up, *in vitro* embryo production program in dairy cattle. **Theriogenology**, v.53, p.355, 2000.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A.. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43 p.151-152, 1995.

HILL B. R., A simple method of transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v.41 p.235, 1995.

IGUMA, L.T.; HASHIMOTO, M.; MOHAMED NOUR, M.S.; TAKASHASHI, Y. Capacidade de desenvolvimento *in vitro* de oócitos recuperados de ovários císticos bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.270, 2000.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7 p.451-460, 1984.

KONISHI, M., AOYAGI, Y. TAKEDOMI, T., *ET AL.*, Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. **Theriogenology**, v.45 p.573, 1996.

KRUIP TH, A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.

LANSBERGEN, L.M.T.E., VAN W. LEEUW A.M., DAAS,J.H.G., RUIG, L., VAN DER STREEK, G., REINDERS, J.M.C., AARTS, M., RODEWIJK, J. Factors affecting ovum pick-up in cattle., **Theriogenology**, v.43 p.259, 1995.

LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON,D.L., Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows., **Theriogenology** v.41 p.73, 1994.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.** v.81 p.301, 1987

MARION, G. B.; GIER, H. T.; CHOUDARY, J. B. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. **J. Anim. Sci.** v.27, p.451, 1968.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; GUILLON, N.; GERARD, O; THIBIER, M. *In vitro* fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. In: International Congress on Animal Reproduction, XII, 1992, Hague, **Proceedings**, v.2, p.662-664.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J.M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: Réunion A.E.T.E., XI, Hannover, **Proceedings**, p.216., 1995.

PEIXER, M.A.S.; CÂMARA, J.U.; NASCIMENTO, N.V.; PAIVA, M.A.N.; RUMPF, R. Produção de animais a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia de vacas com diferentes níveis de fertilidade. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.344-345, 1998.

PIETERSE M.C, KAPPEN, K.A., KRUIP, A. M.TAVERNE, M.A.M.. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. **Theriogenology**, v.30, p.751-756, 1988.

POLLARD, J.W.; MARTINO, A.; RUMPH, N.D.; SONGSASEN, N.; PLANTE, C.; LEIBO, S.P. Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.46, p.849-858, 1996.

REICHENBACH, H. D., WIEBKE, N.H., MÖDL, J., ZHU, J., BREM, G., Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. **J. Rep. Fertil.**, v.101, p.547, 1994.

SAUMANDE, J. PROCUREUR, R., CHUPIN, D. Effect of injection time and anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cow. **Theriogenology** v.21 p.727, 1984.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.141-155, 1998.

SENEDA, M.M; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; PUELKER, R.Z.; OLIVEIRA J.A. Obtenção de embriões bovinos em um caso de obstrução uterina. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.331, 2000.

THONON, F.; ECTORS, F.J.; DELVAL, A.; FONTES, R.S.; TOUATI, K.; BECKERS, J.F. *In vitro* maturation, fertilization and development rates of bovine oocytes connected with the reproductive status of the donor. **Theriogenology** v.39 p.330, 1993.

VINCENT, C., JOHNSON, H.J. , Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. **Reproductive Biology** v.14 p.74-100, 1992.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; PERIPATO, A.C.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. A fecundação *in vitro* como critério de seleção para fertilidade em tourinhos da raça Nelore. **Rev. Bras. Gen.**, v.18, p.236. 1995.

WATANABE, M.R.; ; LÔBO, R.B.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; WATANABE, Y.F. Produção *in vitro* de embriões por sessão de aspiração em fêmeas nelore. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.382-383, 1998.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. Competência de oócitos, oriundos de diferentes fêmeas bovinas, na produção *in vitro* de blastocistos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.384-385, 1998a.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; LÔBO, R.B. Seleção de touros para a produção *in vitro* de embriões. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.388-389, 1998b.

WATANABE, Y.F.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F.V.; WATANABE, M.R. Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.441, 2001.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R.; FRICKE, P. M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J. N.; GIBBONS, J. R., GINTHER, O. J., Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. **Proceedings of the XV annual convention AETA**, p.62, 1996.