

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Veterinária  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

João Gabriel Viana de Grázia

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) NA BOVINOCULTURA DE LEITE  
E DE CORTE**

Belo Horizonte  
2019

João Gabriel Viana de Grázia

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) NA BOVINOCULTURA DE LEITE  
E DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa  
de Pós Graduação em Ciência Animal da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pinho  
Marques Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. João Henrique  
Moreira Viana  
Profa. Dra. Gleide Fernandes Avelar

Belo Horizonte  
2019

G785a Grázia, João Gabriel Viana de, 1987.  
Aspectos da produção in vitro de embriões (PIVE) comercial na bovinocultura, de leite e de corte, com foco na geração de animais de produção. / João Gabriel Viana de Grázia – 2019.

161p.: il.

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

Coorientadores: João Henrique Moreira Viana

Gleide Fernandes Avelar

Tese de Doutorado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Gado de leite– Teses - 2- Gado de corte - Teses – 3 – Bovino– Teses – 4- Nelore - Teses  
I– Júnior, Antônio de Pinho Marques - II – Viana, João Henrique Moreira– III – Avelar, Gleide Fernandes  
VI- Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. V- Título.

**CDD – 636.108926**

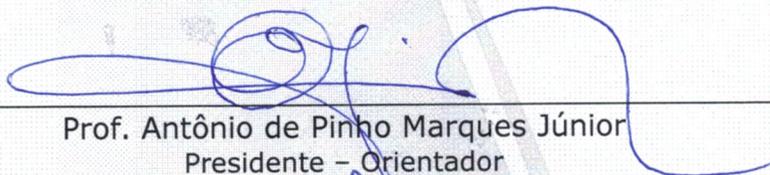
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

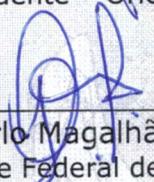
## FOLHA DE APROVAÇÃO

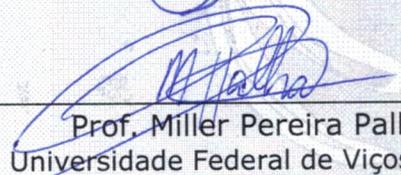
### JOÃO GABRIEL VIANA DE GRÁZIA

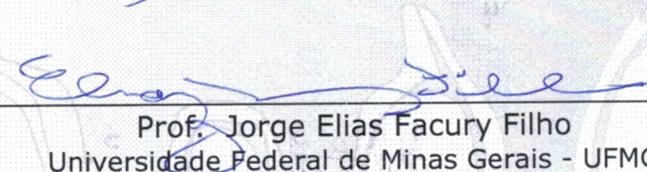
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

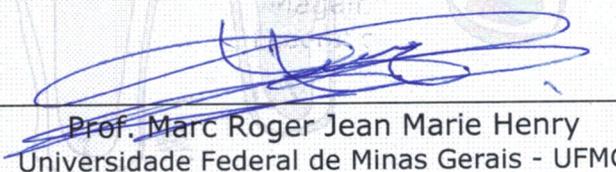
Aprovada em 29 de novembro de 2019 , pela banca constituída pelos membros:

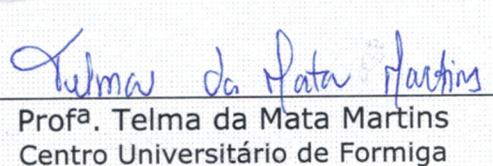
  
Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior  
Presidente - Orientador

  
Prof. Giancarlo Magalhães dos Santos  
Universidade Federal de Viçosa - UFV

  
Prof. Miller Pereira Palhão  
Universidade Federal de Viçosa - UFV

  
Prof. Jorge Elias Facury Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

  
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

  
Profª. Telma da Mata Martins  
Centro Universitário de Formiga

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo durante todo o período de doutorado.

Ao meu amigo e orientador Dr. João Henrique Moreira Viana, por toda atenção, ATP's gasto comigo ao longo de todo esses anos de convívio e por tanto me ensinar. Obrigado pela paciência, carinho e amizade de sempre!!!

Ao Prof. Dr. Raul Marcel (*in memorian*), orientador de mestrado que tem seu registro na minha caminhada. Por todo o conhecimento, conselhos e referência de amor a profissão.

Ao professor Antônio de Pinho Marques Junior, por toda paciência, educação e preocupação durante o período do doutorado.

Aos membros da banca de avaliação, Professores Miller Palhão, Giancarlo Magalhães, Jorge Elias (Lobão), Marc Henry e Telma Martins pela disponibilidade de contribuir de alguma maneira na minha formação, deixando um pouco seus afazeres.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Zootecnia que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmico-científica.

Ao meu melhor amigo e eterno amor, vô BELMIRO (*in memorian*)! Fonte eterna de toda inspiração e transpiração!

Aos meus queridos pai e mãe, por sempre me ajudarem com uma palavra de carinho e apoio nas horas de dificuldade e por tornarem meu caminho sempre mais fácil. Muito obrigado por tudo!!!!

A minha avó Rosinha, por ter feito parte de toda minha vida e estado ao meu lado em todos os momentos!!! Espero que possa desfrutar dessa conquista!

A minha melhor amiga e esposa Julliane (Ju), obrigada por tudo! Por servir de exemplo, por todos os ensinamentos, apoio, carinho e incentivo. Você é parte importante nessa conquista!

Ao meu avô Silvio (*in memorian*), por ser meu exemplo de caráter e conduta humana.

A minha avó-madrinha Mary por todo amor dispensado ao longo de tantos anos.

Ao meu amigo Robson Carvalho, companheiro de caminhada desde o primeiro período da graduação, por sempre me incentivar e apoiar!

Ao amigo e sócio Antônio Carlos (Carlinhos), companheiro de caminhada nos últimos 3 anos e que se tornou peça importante, com discussões, com ensinamentos, com conselhos e com incentivos e sonhando juntos.

Ao meu grande amigo e parceiro, Dr. Giancarlo Magalhães dos Santos, um dos meus maiores incentivadores, obrigado por todos os ensinamentos.

Aos colegas do setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG pela parceria e amizade construída.

Enfim, minha sincera gratidão a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>11</b> |
| 3.1 EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS (PIVE).....                                | 11        |
| 3.3 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DOS OÓCITOS .....   | 14        |
| 3.3.1 O oócito.....  | 15        |
| 3.3.2 A qualidade oocitária aplicada às biotécnicas.....   | 16        |
| 3.3.3 Classificação dos oócitos.....   | 17        |
| 3.3.4 Fatores que afetam a qualidade do oócito .....   | 19        |
| 3.3.4.1 Estado fisiológico da fêmea .....  | 19        |
| 3.3.4.2 Folículo.....  | 20        |
| 3.3.4.3 Nutrição.....  | 21        |
| 3.3.4.4 Idade .....  | 22        |
| 3.3.4.5 Raça da doadora .....  | 23        |
| 3.3.4.6 Intervalos entre as sessões de aspiração folicular .....                                 | 25        |
| 3.3.4.7 Ambiente .....   | 26        |
| 3.3.4.8 Estresse .....   | 26        |
| 3.4 PERCEPÇÃO E APLICAÇÃO PRÁTICA DA PIVE.....   | 27        |
| 3.5 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL E REPROGRAMAÇÃO<br>EPIGENÉTICA .....                     | 34        |
| 3.5.1 Desenvolvimento embrionário inicial .....  | 35        |
| 3.5.2 Programação e reprogramação epigenética .....  | 38        |
| 3.5.3 Tipos de modificações epigenéticas.....  | 41        |
| 3.5.3.1 Metilação do DNA.....  | 41        |
| 3.5.3.2 Modificações de Histonas.....  | 42        |
| 3.5.3.3 RNA's não codificantes.....  | 42        |
| 3.5.3.4 Inativação do cromossomo X.....  | 43        |
| 3.5.3.5 Imprinting genômico .....  | 43        |
| 3.5.4 Reprogramação epigenética das células germinativas primordiais .....                       | 44        |
| 3.5.5 Reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário inicial.....                      | 45        |
| 3.5.6 Desregulação epigenética: Possíveis consequências .....                                    | 47        |
| 3.6 ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS PÓS NATAIS ASSOCIADAS AO USO DA<br>FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> ..... | 48        |
| 3.6.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) .....  | 49        |
| 3.6.2 Alterações fenotípicas indesejáveis relatadas .....  | 54        |
| 3.6.2.1 Alterações ligadas ao tamanho corporal e peso .....                                      | 54        |
| 3.6.2.2 Alterações placentárias .....  | 55        |
| 3.6.2.3 Alterações umbilicais .....  | 56        |
| 3.6.2.4 Problemas cardiovasculares.....  | 57        |
| 3.6.2.5 Impacto na produção animal.....  | 57        |
| 3.6.2.6 Síndromes em Humanos.....  | 58        |
| 3.6.3 Perspectivas do uso da PIVE no conhecimento da epigenética.....                            | 59        |

### Capítulo I

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>        | <b>60</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>     | <b>61</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b> | <b>62</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>63</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>64</b> |
| 3.1 LOCAL E ANIMAIS .....   | 64        |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE DADOS .....                                      | 64        |
| 3.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....                                   | 65        |
| 3.3.1 Coleta dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (CCO).....                   | 65        |
| 3.3.2 Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cumulus</i> -oócito (CCO)..... | 65        |
| 3.3.3 Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....                               | 66        |
| 3.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> dos presumíveis zigotos .....                     | 66        |
| 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 66        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>67</b> |
| 4.1 EFEITO DA RAÇA E CRUZAMENTO NO DESEMPENHO NA OPU – PIVE.....                | 67        |
| 4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E PIVE .....                       | 80        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | <b>83</b> |

## Capítulo II

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>84</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>85</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>86</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>88</b>  |
| 3.1 LOCAL E ANIMAIS .....   | 88         |
| 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....   | 89         |
| 3.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....                                   | 89         |
| 3.3.1 Coleta dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (CCO).....                   | 89         |
| 3.3.2 Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cumulus</i> -oócito (CCO)..... | 90         |
| 3.3.3 Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos (FIV).....                         | 91         |
| 3.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) dos presumíveis zigotos .....               | 92         |
| 3.4 PREPARO DAS RECEPTORAS .....  | 94         |
| 3.5 TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES .....  | 95         |
| 3.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL.....                                | 95         |
| 3.7 NASCIMENTO DOS ANIMAIS .....  | 96         |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 96         |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>97</b>  |
| 4.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....                            | 98         |
| 4.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE).....   | 107        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | <b>121</b> |
| <b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | <b>121</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                      | <b>122</b> |
| <b>ANEXO I</b> .....  | <b>156</b> |

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de literatura

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação dos complexos cumulus-oócitos recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia ..... | 18 |
| Tabela 2: Critérios e parâmetros que estão relacionados com a qualidade do oócito .....                                     | 18 |

### Capítulo I

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Caracterização da base de dados utilizada.....  | 65 |
| Tabela 2: Número e percentual de doadoras submetidas a diferentes números de aspirações .....   | 68 |
| Tabela 3: Recuperação de CCO [Média ± EPM (variação) e valor de P] .....  | 69 |
| Tabela 4: Distribuição das doadoras por quartis com base na produção de CCO totais.....   | 73 |
| Tabela 5: Distribuição por cruzamento.....  | 73 |
| Tabela 6: Total acumulado de CCO recuperados e blastocistos produzidos em aspirações que produziram até 14 oócitos, i.e, abaixo das respectivas médias nas raças Gir e Holandesa..... | 78 |
| Tabela 7: Análise descritiva dos parâmetros avaliados .....   | 80 |
| Tabela 8: Análise de associação (método das correlações de Pearson).....  | 81 |
| Tabela 9: Taxas de blastocistos na PIVE, distribuídas por classes de motilidade (<60%: I, 60 a 65%: II, >65%: III) e vigor (<3: I, 3: II, >3: III) .....                              | 82 |

### Capítulo II

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1: Análise de efeitos principais sobre a PIVE com sêmen sexado para macho .....   | 98  |
| Tabela 2: Efeito do sistema de MIV do oócitos nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP] .....                          | 99  |
| Tabela 3: Efeito de diferentes formulações do meio de MIV nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP].....               | 100 |
| Tabela 4: Efeito do tipo de sêmen nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP] .....                                      | 102 |
| Tabela 5: Efeito do método de preparação do sêmen nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP] .....                      | 104 |
| Tabela 6: Efeito da atmosfera gasosa de cultivo dos embriões nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP] .....           | 106 |
| Tabela 7: Efeito da criopreservação nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....  | 108 |
| Tabela 8: Análise de efeitos principais sobre os resultados da TE (N=2.450) .....  | 108 |
| Tabela 9: Efeito do mês da estação de monta nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%].....   | 109 |
| Tabela 10: Efeito do Escore de condição corporal (ECC), avaliado no dia da transferência do embrião, nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] ..... | 112 |
| Tabela 11: Efeito da ordem de paridade nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%].....  | 113 |
| Tabela 12: Efeito do grupamento racial das receptoras de embrião utilizadas nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....                          | 114 |
| Tabela 13: Efeito do lado do ovário no qual havia a presença do corpo lúteo (CL) nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....                     | 115 |
| Tabela 14: Efeito da qualidade do corpo lúteo (CL) avaliado por palpção retal nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....                        | 115 |
| Tabela 15: Efeito da fazenda na qual foram transferidos os embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%].....                                   | 115 |
| Tabela 16: Efeito do técnico que realizou a transferência dos embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....                               | 116 |
| Tabela 17: Efeito da ordem de transferência dos embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]... ..   | 116 |
| Tabela 18: Efeito do touro utilizado para fertilização <i>in vitro</i> nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] .....                               | 117 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 19: Dia do desenvolvimento do embriãoEfeito do tempo de cultivo (dias do embrião em desenvolvimento no cultivo) nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%] ..... | 118 |
| Tabela 20: Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião selecionado para transferência nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%].....                               | 120 |

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Esquerda: Animal da raça gir. Direita: Animal da raça Holandesa.....  | 64 |
| Figura 2: Disitribuição de frequência das aspirações em função do número de oócitos recuperados nas raças Gir (A) e Holandesa (B).....                    | 71 |
| Figura 3: Distribuição (ordem crescente) das doadoras em função do número total de oócitos recuperados nas raças Gir (A) e Holandesa (B).....             | 71 |
| Figura 4: Percentual acumulado de oócitos recuperados (A) e embriões produzidos (B) em função do número de oócitos recuperados por aspiração .....        | 77 |
| Figura 5: Gráfico BoxPlot das taxas de clivagem (A) e de blastocistos (B) em função do touro utilizado na PIVE (numerados de 1 a 35) .....                | 79 |
| Figura 6: Gráfico BoxPlot das taxas de clivagem (A) e de blastocistos (B) em função do tipo de sêmen utilizado na PIVE (1: sexado, 2: convencional) ..... | 80 |
| Figure 7: Associação entre taxas de clivagem (A), motilidade (B) e vigor (C) do sêmen, e taxas de blastocistos subsequentes.....                          | 82 |

### Capítulo II

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1: Exemplares de animais da raça Nelore que tiveram os ovários coletados .....  | 89  |
| Figura 2: Esquerda: Oócitos imaturos. Direita: oócitos após 22 horas de maturação (B) .....  | 91  |
| Figura 3: Embriões com divisões celulares avaliadas 48-72 horas após a fertilização (D3) .....   | 92  |
| Figura 4 : Embriões em diferentes estágios de blastocistos. Blastocisto inicial-Bi (A), Blastocisto-BI (B), Blastocisto expandido-Bx (C), Blastocisto eclodido-Be (D).....   | 93  |
| Figura 5: Esquerda: Embriões devidamente envasados individualmente em palhetas de 0,25ml. Direita: Palhetas com os embriões dispostos na transportadora de embriões .....  | 93  |
| Figura 6: Esquema do protocolo de sincronização de estro utilizado nas receptoras .....  | 94  |
| Figura 7: Receptoras de embriões que foram utilizadas para receber embriões .....  | 95  |
| Figura 8: Receptoras de embriões com os bezerros ao pé .....   | 96  |
| Figura 9: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com o meio utilizado na MIV dos oócitos.....   | 101 |
| Figura 10: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com o método de preparo de sêmen .....  | 105 |
| Figura 11: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com a atmosfera de cultivo in vitro.....  | 107 |
| Figura 12: Taxa de gestação aos 30 dias (P30), taxa de gestação que foram a termo (Parto), percentual de perdas embrionárias até os 30 dias (PEP) e perdas totais (Total) ao longo da estação de transferência ..... | 110 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de embriões bovinos, no Brasil, passou por grandes modificações ao longo do tempo, refletindo no aumento do uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Essa evolução ocorreu pelo o aumento da eficiência da técnica e redução dos custos, e o uso da técnica influenciou a produção bovina de maneira geral. Além de contribuir nos programas de melhoramento genético, a técnica permite alternativas de acasalamento para geração de animais mestiços. Além disso, mudanças nos sistemas de produção, tanto de leite quanto de carne, induzidas por pressão do mercado em função da necessidade de aumento de produtividade, redução dos custos, aumento do bem estar animal e sistemas de produção sustentáveis podem possibilitar novos nichos para o desenvolvimento da técnica (Viana, Figueiredo e Siqueira, 2017).

O rebanho brasileiro foi estimado em 2018 em 213,5 milhões de animais ficando atrás apenas da Índia em tamanho de rebanho. A produção leiteira em 2014 foi aproximadamente 24 bilhões de litros de leite (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE), ficando atrás somente dos Estados Unidos segundo dados da USDA. Enquanto a produção de carne foi em torno de 10,7 bilhões de toneladas (ABIEC, 2014), fazendo com que o país também ocupe o segundo lugar no ranque de produção de carne. Essa produtividade, entre outros fatores, teve uma contribuição das biotécnicas, como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE), principalmente produzidos *in vitro*. A PIVE no Brasil passou de 12.500 embriões produzidos em 2000 para mais de 353.000 embriões em 2015 (Sartori *et al.*, 2016; Viana, Figueiredo e Siqueira, 2017).

A disponibilidade de sêmen sexado foi um fator marcante para a PIVE, pois permitiu a utilização em gado de leite (Pontes *et al.*, 2010), contribuindo para o aumento da quantidade de embriões produzidos. Atualmente as raças leiteiras, zebuínas, taurinas e cruzadas, são responsáveis pela maior parte dos embriões do país. Um cenário bastante diferente do início do uso da técnica comercialmente, no qual as raças de corte zebuínas, com destaque para a raça Nelore, eram as responsáveis pela maior parte dos embriões (Viana, Figueiredo e Siqueira, 2017). No gado de leite os animais mestiços (*Bos taurus X Bos indicus*) têm sido os responsáveis por grande parte dos embriões produzidos. Por outro lado, em gado de corte isso ainda é incipiente e pouco utilizado, principalmente quando avaliamos o potencial de

aplicação nesse nicho de mercado baseado no tamanho do rebanho brasileiro. De maneira geral, a produção de animais mestiços utilizando o cruzamento Zebuino X Taurino é uma estratégia adotada que permite aproveitar o vigor híbrido, aliando a resistência do gado zebuino com a alta produção do gado taurino (Facó *et al.*, 2008). Justamente por isso, em ambos os casos, o animal mestiço tem como principal finalidade a produção, diferindo do mercado de genética, no qual o animal considerado puro tem objetivo o melhoramento da raça e a disseminação daquela genética.

Os resultados da PIVE podem ser influenciado por diversos fatores, incluindo variações individuais das doadoras, o ambiente folicular no qual os oócitos se desenvolvem, estacionalidade reprodutiva, fatores ligados ao sêmen, raça da doadora, qualidade do oócito e o ambiente de cultivo dos embriões (Camargo *et al.*, 2006; Lonergan *et al.*, 2006). Sabe-se, por exemplo, que os oócitos provenientes de fêmeas taurinas apresentam menor competência nos processos de PIVE quando comparados àqueles provenientes de animais zebuino (Camargo *et al.*, 2006). As particularidades de cada raça, de cada região e com as mudanças no mercado de embriões se torna necessários buscar alternativas e ajustes de forma a manter a eficiência do processo independente dessas variáveis. Apesar de números expressivos, resultados satisfatórios e uma notável evolução da técnica ao longo dos anos, a PIVE ainda apresenta falhas, como taxas de perdas gestacionais relativamente altas conforme aponta o estudo de Sponchiado *et al.* (2019). Isso demonstra a necessidade de entender as limitações da técnica do ponto de vista comercial, e buscar alternativas de corrigir as falhas, melhorar os índices e reduzir custos de forma a ampliar a sua utilização.

## **2. OBJETIVOS**

O trabalho consiste de dois capítulos, em ambos relacionados a PIVE, no entanto, no primeiro capítulo o banco de dados analisado foi referente a gado de leite, enquanto o segundo capítulo o banco de dados é referente a gado de corte. Os objetivos de cada capítulo foram:

- Estudar o papel da doadora de oócitos, na variação dos resultados observados, na produção *in vitro* de embriões em duas raças leiteiras;

- Identificar e compreender fontes de variação dos resultados da produção *in vitro* de embriões e transferências de embriões em um programa de grande escala em gado de corte comercial.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS (PIVE)

O nascimento do primeiro bezerro produzido por FIV a partir de oócitos recuperados cirurgicamente ocorreu em 1981. Por falta de meios de cultivo confiáveis disponíveis na época, os embriões foram transferidos ainda no estágio de 4 células. Nas décadas seguintes, diversas tentativas de aumentar a eficiência da PIVE foram realizadas, e levaram ao desenvolvimento do protocolo padrão utilizado atualmente, no qual a transferência ocorre entre o 6º e o 8º dia pós-fecundação, sendo preferencialmente realizado no sétimo dia. Após estas alterações, diversos grupos começaram a focar no desenvolvimento dos meios de cultivo (Jones *et al.*, 2001; Biggers, 2002; Summers e Biggers, 2003; Van Wagtenonk-De Leeuw, 2006).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam diversas diferenças em relação aos produzidos *in vivo*, tais como menor quantidade de células, maior acúmulo de lipídeos e menor criotolerância dentre outras (Lonergan *et al.*, 2003). Estas diferenças provavelmente são influenciadas por vários fatores, como raça, qualidade do oócito, ambiente intrafolicular, interação touro/vaca e ambiente de cultivo embrionário. Os embriões produzidos *in vitro* geralmente possuem uma coloração mais escura, menor número de células, menor compactação, formação preCCOe da blastocel, e alterações na relação massa celular interna (ICM): células do trofoblasto, quando comparados àqueles que se desenvolvem *in vivo*, assim como maior frequência de apoptose, menor tolerância à criopreservação e alterações na expressão gênica e metabolismo celular (Knijn *et al.*, 2002; Camargo *et al.*, 2006; Lonergan *et al.*, 2006). Diversos transcritos que parecem estar envolvidos de forma importante no desenvolvimento pré-implantação são afetados pelo tipo de meio de cultivo e pelo tipo de suplemento protéico (Knijn *et al.*, 2002).

Segundo Knijn *et al.* (2002), blastocistos derivados de oócitos maturados com protocolos diferentes, mas cultivados de forma idêntica, não demonstraram diferenças significativas em relação à expressão dos genes avaliados. Desta forma, o ambiente de cultivo (pós-fecundação) pode estar relacionado com a alteração do padrão de expressão gênica no embrião, que por sua vez pode ter implicações na qualidade e viabilidade do blastocisto. Além disso, após a transferência, os embriões produzidos *in vitro* possuem menor potencial de implantação e desenvolvimento em relação aos embriões produzidos *in vivo*, o que frequentemente tem sido associado à ocorrência de anormalidades fetais e problemas perinatais (Numabe *et al.*, 2000; Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2006).

### 3.2 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DOS BOVINOS: BOS INDICUS E BOS TAURUS

A emergência da civilização moderna foi acompanhada, dentre outras coisas, pela adaptação e cruzamento de animais de cativeiro. No caso dos bovinos, a consequência disso foi o desenvolvimento de raças individuais diferindo em, por exemplo, produção de leite, qualidade da carne, tolerância ou resistência a doenças e pragas. No entanto, o genótipo e a história dos bovinos ainda não é conhecida em detalhes. Os bovinos ocorrem em dois grandes grupos geograficamente distintos taurinos (europeu, africano e asiático) e o indiano, ou zebu (sul-asiático e oeste-africano), os quais provavelmente divergiram a mais de 250 mil anos atrás (The Bovine Hapmap Consortium, 2009).

Atualmente a maior parte do gado zebuino (*Bos indicus*) mundial vive em regiões entre o Trópico de Câncer e o de Capricórnio, onde a nutrição, o balanço térmico, a produção de leite e a reprodução estão sujeitas a temperaturas e umidade relativa altas. Os animais zebuínos já são bem adaptados a estas regiões, apresentando maior tolerância ao estresse térmico (Camargo *et al.*, 2007). Já o gado taurino (*Bos taurus*) pode não ser uma opção viável para a produção de leite em países tropicais devido à sensibilidade ao calor e a ectoparasitos, com consequente queda na produção. Embora diversas raças taurinas tenham sido introduzidas nos Trópicos por desde os anos 1800, em um esforço para aumentar comparativamente os baixos níveis de produção leiteira do gado zebuino (Gordon, 2004). As raças zebuínas contribuem de forma significativa para a indústria de carne e leite em países

tropicais (Bo, Baruselli e Martinez, 2003). No entanto, as raças taurinas têm médias de produção de carne e leite mais elevadas, e um histórico relacionado com o melhorado genético mais antigo, que remonta ao século XIX.

Raças zebuínas apresentam algumas particularidades em sua fisiologia ovariana, como no número de ondas de crescimento, momento da divergência, tamanho máximo, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular, etc. (Rhodes *et al.*, 1995; Viana *et al.*, 2000; Sartorelli *et al.*, 2005), quando comparadas com raças europeias (Van Wagtenokn-De Leeuw, 2006). Estas características podem determinar o maior número de pequenos folículos em crescimento nos ovários destes animais e, conseqüentemente, um maior número de CCO recuperados por OPU (Viana *et al.*, 2004), quando comparados com resultados de *Bos taurus* (Van Wagtenokn-De Leeuw, 2006). Em outro estudo, Carvalho *et al.* (2008) também descreveram um número maior de folículos sendo recrutados por onda de crescimento folicular em fêmeas zebuínas do que em taurinas (cerca de 34 e 25, respectivamente). Esta característica, particularmente, tem influência direta nos resultados obtidos pela técnica de transferência de embriões e de OPU-PIVE, uma vez que possibilita a coleta de um número maior de folículos, indicando uma vantagem do uso de fêmeas zebuínas sobre taurinas como doadoras (Baruselli, Gimenes e Sales, 2007).

Outras características podem ter relação com o melhor desempenho de fêmeas zebuínas na produção de gametas e embriões em regiões tropicais e subtropicais. Um exemplo seria a melhor adaptação desses animais ao ambiente. Embriões zebuínos tendem a atingir maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, principalmente em períodos sazonais mais quentes, indicando que estes embriões podem possuir uma termotolerância maior do que os taurinos (Camargo *et al.*, 2007).

A observação do comportamento de embriões zebuínos e taurinos em ambiente de cultivo *in vitro* sugere que exista alguma forma de regulação em resposta a este sistema que permita, bloqueie ou altere o desenvolvimento embrionário normal. A identificação de variações nos padrões de expressão gênica pode ser uma forma de avaliar se variações a nível molecular podem estar envolvidas na manifestação de alterações morfológicas associadas ao ambiente de produção *in vitro*, e que sejam relacionadas com a raça dos animais utilizados como doadores dos oócitos (Wohlres-Viana, 2010).

### 3.3 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DOS OÓCITOS

Em mamíferos, as fêmeas adquirem, ainda na fase fetal, os gametas que serão disponibilizados durante toda sua vida reprodutiva (Marteil *et al.*, 2009). Esses gametas, denominados como oócitos ou ovócitos, são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário inicial, sendo responsáveis pela grande maioria das organelas e moléculas, como RNA's e proteínas, que estarão presentes nas primeiras células embrionárias (Wang e Sun, 2007). Dessa forma, oócitos de boa qualidade são essenciais para o sucesso reprodutivo de animais e humanos, seja por meio da reprodução convencional ou através do uso das técnicas da reprodução (Lasiene *et al.*, 2009). Porém, por estarem presentes nos ovários desde o nascimento, essas células estão sujeitas a influência de fatores externos durante toda a vida da fêmea, o que pode afetar a qualidade dos mesmos (Camargo *et al.*, 2005; Roth *et al.*, Sharma *et al.*, 2013; Koyama *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014). Além disso, a reprodução de uma fêmea, em uma escala de priorização do uso metabólico da energia disponível será a última a ser beneficiada (Short e Adans, 1998). Assim, os oócitos podem ter sua capacidade de desenvolvimento comprometido por diversos fatores, sendo alguns desses fatores já conhecidos a relação com a qualidade do oócito e outros ainda com pouco conclusivos. Esse comprometimento da qualidade e conseqüentemente do potencial de desenvolvimento dos oócitos reflete nos resultados reprodutivos, incluindo os obtidos nas técnicas da reprodução.

Com o surgimento das técnicas, principalmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE), muito desses parâmetros de qualidade do oócito e fatores que afetam essa qualidade foram melhor compreendidos (Merton *et al.*, 2003). A possibilidade de coletar esses gametas e mantê-los em condições laboratoriais permitiu estudar e entender melhor o desenvolvimento embrionário inicial e os fatores que o influenciam. Como forma de prever esse potencial de desenvolvimento e pré-selecionar oócitos de boa qualidade, alguns protocolos de classificação de oócitos foram estabelecidos (Viana *et al.*, 2004; Lasiene *et al.*, 2009). Esses protocolos, de forma geral, levam em consideração apenas aspectos morfológicos, porém, os parâmetros celulares e moleculares que podem ser afetados por diversos fatores ambientais ou fisiológicos não são considerados (Ebner *et al.*, 2000).

### 3.3.1 O oócito

O oócito é uma célula complexa composta por muitas organelas e que assume papel crucial na reprodução da fêmea (Trimarchi *et al.*, 2006). Nos vertebrados, os oócitos podem ter o seu desenvolvimento paralisado em prófase da primeira divisão meiótica durante semanas, meses ou até mesmo anos. Durante esse período, os oócitos acumulam várias moléculas necessárias para sua maturação e para o desenvolvimento embrionário posterior, tais como: mRNA, proteínas, lipídeos e açúcares (Marteil *et al.*, 2009). A alteração da posição dos componentes do fuso meiótico ou a disfunção de organelas como os grânulos corticais ou as mitocôndrias, podem diminuir a viabilidade do oócito e ter um impacto crucial na qualidade e no desenvolvimento do futuro embrião (Sun *et al.*, 2001).

Essa célula contribui não apenas com metade do material genético fornecido no momento da fertilização, como também praticamente todo o citoplasma ao futuro zigoto, fornecendo além das organelas, os transcritos necessários para o desenvolvimento inicial do embrião (Schultz, 2002; Wang e Sun, 2007; Marteil *et al.*, 2009). Isso porque o embrião nessa fase não possui capacidade de transcrever seu próprio material genético, sendo assim, o ambiente citoplasmático do oócito oferece as condições adequadas para seu desenvolvimento. Os transcritos maternos podem participar na ativação do genoma embrionário, influenciando no momento em que ela irá ocorrer (Vigneault *et al.*, 2004), sendo esta etapa variável entre as espécies. Em virtude disso, a qualidade do oócito torna-se essencial ao desenvolvimento embrionário antes e após a ativação de seu genoma, considerando que o subsequente desenvolvimento embrionário depende de sua apropriada ativação (Camargo *et al.*, 2006).

A qualidade dos oócitos é normalmente definida como a capacidade de se desenvolver até o estágio de blastocisto (Mermillod *et al.*, 2008). Essa definição frequentemente leva em consideração a capacidade dos oócitos de se desenvolverem em sistemas *in vitro* (Merton *et al.*, 2003). No entanto, a qualidade oocitária influencia de maneira geral a reprodução dos animais, apresentando efeitos na fertilização monospermica, no desenvolvimento inicial, e na implantação dos embriões. Também influenciam na retomada da meiose, na clivagem do zigoto, no desenvolvimento embrionário até estágio de blastocisto, na implantação uterina e na saúde da prole ao nascimento. Portanto é necessário que os oócitos de boa qualidade sejam utilizados para se obter bons resultados reprodutivos (Lasiene *et al.*, 2009). Na PIVE é mais fácil avaliar a qualidade dos oócitos, quando comparado as outras biotécnicas (Inseminação

artificial e superovulação e transferência de embriões), uma vez que esse gameta é coletado, maturado, fertilizado e cultivado *in vitro*. Isso torna possível avaliar os aspectos morfológicos e a competência do desenvolvimento dos mesmos em todas as etapas citadas anteriormente. Já ao realizar a monta natural ou utilizar outros tipos de biotécnicas, só se consegue hipotetizar sobre a qualidade dos oócitos e isso se dá por meio da avaliação da coleta dos embriões que serão implantados ou ao final com a taxa de gestação.

### 3.3.2 A qualidade oocitária aplicada às biotécnicas

Nas últimas décadas, o avanço das biotécnicas ligadas à reprodução possibilitou o melhor aproveitamento dos recursos genéticos disponíveis na bovinocultura, permitindo o melhoramento dos rebanhos e, no caso da pecuária leiteira, aumentando a produção média de leite das vacas (Kruip *et al.*, 2000). Dentre as biotécnicas da reprodução empregadas comercialmente na bovinocultura destacam-se a inseminação artificial, a transferência de embriões produzidos *in vivo* através da indução de múltiplas ovulações (MOET) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Milazzotto *et al.*, 2008). Tais biotécnicas têm como objetivo o maior progresso genético, obtido com a utilização tanto de touros quanto de vacas de elevado potencial genético (Neves *et al.*, 2010). Apesar da importância inicial da MOET para o mercado de embriões, foi com a disseminação das técnicas de aspiração folicular ovariana e produção *in vitro* de embriões (PIVE) que o Brasil conseguiu ser responsável por aproximadamente 59% dos embriões bovinos produzidos no mundo, com 353.539 transferidos (Perry, 2016).

Os avanços nas pesquisas em reprodução são fundamentais para o país manter esta posição de destaque no cenário mundial. Neste sentido, a identificação dos aspectos ligados à qualidade de oócitos e embriões produzidos *in vitro* e o aumento da eficiência da PIVE, são indispensáveis. Contudo, diversos fatores podem influenciar os resultados da PIVE, incluindo variações individuais das doadoras, o ambiente folicular no qual os oócitos se desenvolvem, a sazonalidade reprodutiva, os fatores ligados ao sêmen, à raça da doadora, ao ambiente de cultivo dos embriões e a qualidade do oócito (Camargo *et al.*, 2006; Lonergan *et al.*, 2006). Sabe-se, por exemplo, que os oócitos provenientes de fêmeas da raça Holandesa apresentam

menor competência nos processos de PIVE quando comparados àqueles provenientes de animais da raça Gir (Camargo *et al.*, 2006).

Diferenças na produção de embriões *in vitro* entre raças zebuínas e taurinas (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006) são evidentes e podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como: a melhor adaptação ao ambiente tropical das raças zebuínas, diferenças na dinâmica folicular (número de ondas de crescimento, momento da divergência, tamanho máximo dos folículos, persistência dos folículos dominantes e perfil de recrutamento folicular), alterações de expressão gênica, entre outras (Rhodes *et al.*, 1994; Viana *et al.*, 2000; Sartorelli *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2006; Wohlrres-Viana *et al.*, 2011). Vários desses fatores podem contribuir para afetar a qualidade dos oócitos e consequentemente a diferença de produção entre as duas raças. Além disso, é possível notar que embriões produzidos *in vitro* e *in vivo também* possuem diferenças que envolvem aspectos morfológicos e moleculares que podem estar ligados a eficiência da PIVE e ao ambiente de cultivo de uma maneira geral, alterando as taxas de produção de embriões e de gestação. Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento são o primeiro requisito para o sucesso na PIVE. Sendo assim, uma alternativa adotada rotineiramente para a seleção dos melhores oócitos é a realização de uma classificação morfológica e para isso existem algumas classificações disponíveis na literatura.

### 3.3.3 Classificação dos oócitos

A classificação morfológica dos oócitos é considerada subjetiva por alguns autores, pois pode variar entre os observadores e é dependente da experiência de quem analisa, entretanto, pode fornecer informações importantes para pré-seleção de oócitos de boa qualidade (Palma, 2001; Wang e Sun, 2007). Além disso, é a maneira mais comum que permite avaliar os oócitos de forma menos invasiva e sem inviabilizá-los para o uso posterior, como para a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, a eficácia na determinação em garantir a capacidade de desenvolvimento pós-fertilização não é garantida (Ebner *et al.*, 2000).

Rotineiramente utiliza-se a avaliação do complexo *cumulus*-oócito (CCO) a fim de prever a qualidade oocitária. Para isso, os protocolos de classificação de oócitos disponíveis

na literatura, em todos eles, consideram os mesmos parâmetros avaliados; quantidade de células da granulosa (*cumulus*) ao redor do oócito e o aspecto de seu citoplasma. De maneira geral, o melhor oócito é aquele que possui mais células ao seu redor e tem o ooplasmã mais homogêneo e escuro (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos complexos cumulus-oócitos recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia

| Classificação            | Descrição  |
|--------------------------|--|
| Grau I                   | CCO compacto, mais do que 3 camadas de células do <i>cumulus</i> e oócito com citoplasma homogêneo                         |
| Grau II                  | CCO compacto, com 3 ou menos camadas de células do <i>cumulus</i> , ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo         |
| Grau III                 | Oócitos mostrando remoção completa das células do <i>cumulus</i> em menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida            |
| Desnudo e/ou degenerado  | Oócitos com nenhuma célula do <i>cumulus</i> sobre a maior parte da zona pelúcida e/ou vacuolização retração do citoplasma |
| <i>Cumulus</i> expandido | CCO mostrando expansão das células do <i>cumulus</i> .   |

Adaptado de Viana *et al.*, 2004

Além dos dois parâmetros citados acima, outras características morfológicas dos oócitos também podem ser observadas para se avaliar a qualidade (Tabela 2).

Tabela 2: Critérios e parâmetros que estão relacionados com a qualidade do oócito

| Critério                        | Parâmetros   | Referências  |
|---------------------------------|--|--|
| Complexo <i>cumulus</i> -oócito | Compactação e espessura do <i>cumulus</i> , brilho do citoplasma | (Blondin e Sirard, 1995; Nagano <i>et al.</i> , 2006)                                      |
| Citoplasma                      | Granularidade, coloração, regiões de agrupamento de organelas    | (Serhal <i>et al.</i> , 1997; Balaban <i>et al.</i> , 1998; Kahraman <i>et al.</i> , 2000) |
| Corpúsculo polar                | Formato (redondo ou  | (Ebner <i>et al.</i> , 2000)   |

|                      |   |                                   |
|----------------------|---|-----------------------------------|
|                      | ovoide), tamanho (grande ou pequeno), superfície (liso ou rugoso), citoplasma (intacto ou fragmentado). |                                   |
| Zona pelúcida        | Espessura e estrutura   | (Gabrielsen <i>et al.</i> , 2001) |
| Espaço perivitelineo | Tamanho (normal ou aumentado), e presença ou ausência de grãos.   | (Hassan-Ali <i>et al.</i> , 1998) |

Modificado de Lasiene, 2009.

### 3.3.4 Fatores que afetam a qualidade do oócito

#### 3.3.4.1 Estado fisiológico da fêmea

O estado fisiológico da fêmea influencia na qualidade de seus oócitos. Sabe-se que animais adultos não lactantes apresentam maior produção de blastocistos na PIVE quando comparados com fêmeas adultas lactantes e novilhas (púberes e pré-púberes). Além disso, as fêmeas em lactação apresentaram uma menor quantidade de oócitos recuperados na aspiração folicular (Guerreiro *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014). Esses resultados indicam, que além de uma menor quantidade de oócitos, os mesmos apresentam uma menor competência de desenvolvimento nos animais durante a lactação. Porém, nessa fase outros fatores como a nutrição e a interferência ambiental, principalmente pelo estresse calórico, podem agir na qualidade oocitária (Baruselli *et al.*, 2016a). Em outro estudo com animais lactantes demonstrou que animais em fase final de lactação, apresentaram menor taxa de produção de blastocistos quando comparados com animais em fase inicial. Indicando que esses animais no final da lactação são propensos à resistência a insulina, o que influencia na qualidade dos oócitos e pode contribuir para uma menor eficiência na PIVE (Baruselli *et al.*, 2016b). Por outro lado, em animais fora do período de lactação, quando se realiza a aspiração folicular em doadoras gestantes, o resultado da taxa de blastocistos é maior comparada a animais púberes e pré-púberes (Bayeux *et al.*, 2016).

Já os resultados no período pós-parto inicial são bastante contraditórios, tanto para bovinos de corte quanto de leite. Um possível efeito seja o estresse metabólico em função da lactação que atua na competência de desenvolvimento do oócito (Matoba *et al.*, 2012). Em um trabalho utilizando inseminação artificial foram encontradas alterações endócrinas e metabólicas no microambiente do folículo dominante (Leroy *et al.*, 2012). Em contrapartida, outro estudo não obteve evidências do efeito do estresse metabólico na qualidade do oócito. Embora tenha sido relatado efeito do período pós-parto na quantidade de oócitos viáveis em raças de corte, não observou efeito na taxa de blastocistos, tanto para raças de corte quanto para as de leite (Sala, 2013).

Em rebanhos leiteiros, a seleção dos animais geralmente é baseada na produção de leite. Esse tipo de seleção muitas vezes impacta na fertilidade dos animais selecionados para alta produção que apresentam sistema metabólico peculiar. O perfil metabólico desses animais apresentam baixas concentrações circulantes de progesterona ( $P_4$ ) e estradiol ( $E_2$ ) e aumento das concentrações de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e Beta-hidroxiacetato (BHBA) (Leroy *et al.*, 2005; Wiltbank *et al.*, 2006). Essas características metabólicas refletem diretamente no microambiente folicular, tornando-o sub-ótimo e comprometendo a qualidade do oócito e prejudicando a fertilidade da vaca (Sartori *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2004; Wiltbank *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008a, 2008b). Nesses casos, a qualidade dos oócitos pode ser considerada um importante fator que contribui para essa baixa fertilidade (Walsh *et al.*, 2011).

#### 3.3.4.2 Folículo

O crescimento do oócito dentro do folículo é um processo lento que na espécie bovina dura cerca de seis meses (Lussier *et al.*, 1987). No decorrer desse período, o oócito adquire sua competência e sofre maturação meiótica por uma interação com as células da teca e da granulosa (Miyano, 2003). Através dessas interações acumulam transcritos e proteínas que guiará as etapas de maturação, fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião (Kruip *et al.*, 2000). A qualidade e competência do oócito também estão relacionadas ao ambiente folicular e sua qualidade (Camargo *et al.*, 2006).

Naturalmente, em bovinos, apenas um oócito será ovulado para ser fertilizado e gerar uma gestação. No entanto, com o advento das biotécnicas da reprodução tornou-se possível a recuperação e utilização de diversos oócitos que estão em estádios diferentes da onda folicular no momento da aspiração (Merton *et al.*, 2003). De maneira geral, o ciclo estral em bovinos é composto por duas ou três ondas foliculares (Adams *et al.*, 1992). A primeira onda se inicia no primeiro dia do ciclo, com o aumento da concentração circulante do hormônio folículo estimulante (FSH) que estimulará o crescimento de um grupo de folículos, fase conhecida como recrutamento. Esse grupo de folículos continua crescendo, até que um deles começa a se desenvolver mais rápido que os demais. Mais conhecida como fase de dominância, é nesse momento que este folículo torna-se o futuro folículo dominante, enquanto os outros serão subordinados (Ginther *et al.*, 1996; Hagemann *et al.*, 1999). Dessa maneira, de todos os folículos que iniciaram o crescimento no início do ciclo apenas um irá passar pela fase final de maturação folicular e oocitária, e posteriormente ovulará. Os demais irão entrar em atresia, que é um processo caracterizado pela degeneração folicular (Hsueh *et al.*, 1994). Assim, dependendo do momento em que é realizada a aspiração folicular, pode-se recuperar a grande maioria dos oócitos que se tornariam atrésicos numa ovulação natural. Isso impactará na produção de embriões por afetar sua competência, sendo o tamanho do folículo de origem um importante parâmetro que influencia essa competência (Fair *et al.*, 1997).

#### 3.3.4.3 Nutrição

A nutrição é capaz de alterar metabolitos e hormônios que estão diretamente ligados à reprodução. O estado nutricional somado a ingestão de matéria seca controla duas substâncias reconhecidas importantes para o funcionamento endócrino reprodutivo na fêmea bovina, a insulina e o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1). Os efeitos provocados pela nutrição estão relacionados aos tipos de ingredientes contidos na dieta, a quantidade de ingestão de matéria seca, a duração da superalimentação e o número de tratamentos por dia. Esses efeitos podem causar mudanças metabólicas, fisiológicas e endócrinas, comprometendo o desenvolvimento do folículo e do oócito a nível molecular (Sartori *et al.*, 2017).

Embora seja complexo entender os efeitos da composição da dieta nos hormônios metabólicos e na função ovariana, as mudanças na qualidade dos oócitos são associadas com mudanças induzidas pela dieta na concentração da insulina, IGF-1 e leptina (Rooke *et al.*, 2009). Os efeitos da nutrição afetam indiretamente a reprodução quando, por exemplo, são fornecidas dietas com alto teor de amido que aumentam as concentrações plasmáticas de insulina, isso pode melhorar a retomada da ciclicidade pós-parto e aumentar o recrutamento de pequenos folículos (Gong *et al.*, 2002; Garnsworthy *et al.*, 2008). Por outro lado, dietas ricas em gordura, principalmente com ácidos graxos saturados, resultam em concentrações mais baixas de insulina que pode aumentar o recrutamento de pequenos folículos, além de ser benéfico para a competência e desenvolvimento dos oócitos (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007; Garnsworthy *et al.*, 2008b).

Apesar de ser nítida esta interferência nutricional sobre a qualidade dos oócitos, os dados disponíveis na literatura sobre esse assunto ainda são muito contraditórios e não estão completamente elucidados (Adamiak *et al.*, 2005; Bender *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2014; Parr *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2015). Porém, é bem estabelecido que fatores como a duração da superalimentação, do tipo de dieta, do grupamento genético, da categoria animal, da interação com escore de condição corporal (ECC), dos efeitos do período de transição e da condição fisiológica da vaca são determinantes para qualidade oocitária. Além disso, os trabalhos apresentam algumas peculiaridades que os diferenciam, como a forma de avaliar a qualidade dos oócitos (classificação morfológica, análise molecular, competência de desenvolvimento *in vitro* ou *in vivo*, taxa de gestação por inseminação artificial) entre outras. Em função dessas diversas variáveis envolvidas se torna muito difícil extrapolar os resultados dos diferentes trabalhos e também elucidar de forma clara os reais efeitos da nutrição na qualidade dos oócitos (Sartori *et al.*, 2017).

#### 3.3.4.4 Idade

A competência do oócito varia com a idade das doadoras (Camargo *et al.*, 2006). Diferenças são observadas no tamanho do oócito, no seu metabolismo energético e na atividade dos fatores citoplasmáticos para maturação em novilhas pré-púberes, o que resulta

em baixa competência de desenvolvimento oocitária (Steeves e Gardner, 1999; Salamone *et al.*, 2001).

Com o surgimento de diversas ferramentas que permitem avaliar o potencial genético do animal preCCOemente, tem-se aumentado o interesse em se produzir embriões de animais cada vez mais novos. Já existem relatos de sucesso na PIVE com oócitos recuperados de animais pré-púberes, no entanto foi demonstrado que a competência oocitária nesses animais é menor em comparação a animais adultos e novilhas púberes (Majerus *et al.*, 1999; Taneja *et al.*, 2000).

Do mesmo modo, fêmeas com idade avançada, que atingem o período considerado como idade pós-reprodutiva ou pós-ovulatória apresentam uma redução da qualidade do oócito (Mitteldorf e Goodnight, 2013; Koyama *et al.*, 2014). Isso ocorre porque o sistema reprodutivo feminino envelhece relativamente cedo quando comparado com outros sistemas do organismo e assim resulta na interrupção do funcionamento normal dos ovários com alterações morfológicas e celulares (Faddy *et al.*, 1992; Tilly e Sinclair, 2014). Embora exista poucos relatos das mudanças ocasionada pela idade nos oócitos, já se sabe que há um aumento no estresse oxidativo (Takahashi *et al.*, 2009), diminuição dos níveis de ATP intracitoplasmático (Selesniemi *et al.*, 2008) e disfunção mitocondrial (Wilding *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011). A atividade e até mesmo a quantidade dessa organela reduz com o avançar da idade e ocorre um comprometimento de funções importantes, como homeostase oxidação-redução e controle da morte celular (apoptose). Todas essas alterações provocam efeitos negativos no desenvolvimento do oócito, na maturação meiótica, na fertilização e até mesmo no desenvolvimento embrionário inicial (Tilly e Sinclair, 2014). Como consequência dessa natural redução da qualidade do oócito no período pós-reprodutivo, esses indivíduos apresentam uma redução da fertilidade de maneira geral, incluindo os resultados nas biotécnicas da reprodução (Van Kooji *et al.*, 1996).

#### 3.3.4.5 Raça da doadora

Os bovinos se distribuem em dois grandes grupos geograficamente distintos: os taurinos (europeu, africano e asiático) e os indianos ou zebus (sul-asiático e oeste-africano), os quais provavelmente divergiram a mais de 250 mil anos atrás (The Bovine Hapmap

Consortium, 2009). Atualmente a maior parte do gado zebuino (*Bos indicus*) mundial vive em regiões entre o Trópico de Câncer e o de Capricórnio, onde a nutrição, o balanço térmico, a produção de leite e a reprodução estão sujeitas a fatores ambientais como a temperatura e a umidade relativa do ar. Os animais zebuínos já são bem adaptados a estas regiões, apresentando alta tolerância principalmente ao estresse térmico (Camargo *et al.*, 2007). Já o gado taurino (*Bos taurus*) pode não ser uma opção viável para a produção de leite em países tropicais devido à sensibilidade ao calor e a ectoparasitos, com conseqüente queda na produção. Diversas raças taurinas têm sido introduzidas nos Trópicos desde os anos de 1800, em um esforço para aumentar comparativamente os baixos níveis de produção leiteira do gado zebuino (Gordon, 2004).

Raças zebuínas apresentam algumas particularidades em sua fisiologia ovariana, como o número de ondas de crescimento folicular, momento da divergência, tamanho do folículo dominante, persistência dos folículos dominantes e perfil de recrutamento folicular (Rhodes *et al.*, 1994; Viana *et al.*, 2000; Sartorelli *et al.*, 2005) quando comparadas com as raças europeias (taurinos) (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Estas características podem determinar o aumento de número de pequenos folículos em crescimento nos ovários destes animais e, conseqüentemente, um maior número de CCO's recuperados na aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick-up* - OPU) (Viana *et al.*, 2004), quando comparados com resultados de *Bos taurus* utilizando a mesma técnica (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Em outro estudo, Carvalho *et al.* (2008) também descreveram um número maior de folículos sendo recrutados por onda de crescimento folicular em fêmeas zebuínas do que em taurinas (cerca de 34 e 25, respectivamente). Esta característica, particularmente, tem influência direta nos resultados obtidos pela técnica de transferência de embriões (TE) e de OPU-PIVE, uma vez que possibilita a coleta de um número maior de oócitos, indicando uma vantagem do uso de fêmeas zebuínas sobre taurinas como doadoras (Baruselli e Gimenes, 2007).

Outras características podem ter relação com o melhor desempenho de fêmeas zebuínas na produção de gametas e embriões em regiões tropicais e subtropicais. Um exemplo seria a melhor adaptação desses animais ao ambiente. Embriões zebuínos tendem a atingir maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, principalmente em períodos sazonais mais quentes, indicando que estes embriões podem possuir uma termotolerância maior do que os taurinos (Camargo *et al.*, 2007).

A observação do comportamento de embriões zebuínos e taurinos em ambiente de cultivo *in vitro* sugere que exista alguma forma de regulação em resposta a este sistema, causando um bloqueio ou alteração no desenvolvimento embrionário normal. A identificação de variações nos padrões de expressão gênica pode ser uma forma de avaliar se variações a nível molecular podem estar envolvidas na manifestação de alterações morfológicas associadas ao ambiente de produção *in vitro*, e que sejam relacionadas com a raça das doadoras de oócitos (Wohlres-Viana, 2010).

A influência da raça na competência de oócitos e de embriões é evidente em algumas espécies. Essa diferença pode ser causada por algum fator ligado a genética da mãe ou a seu conteúdo citoplasmático (Bavister, 1995). O efeito da raça na qualidade do oócito torna-se mais evidente quando associada com as condições ambientais. No caso de bovinos, a habilidade de controle da temperatura corporal observado em raças zebuínas, é uma característica que pode estar ligada a uma adaptação genética a nível celular que possibilita a essa raça sobreviver em climas mais quentes, resultando em uma maior competência do oócito em situações de estresse calórico. O mesmo não é verificado em vacas da raça taurina quando submetidas às mesmas condições ambientais (Hansen, 2007; Paula-Lopes *et al.*, 2013).

#### *3.3.4.6 Intervalos entre as sessões de aspiração folicular*

O intervalo das sessões de aspiração influencia não só a qualidade dos oócitos, mas também em sua quantidade. Intervalos mais curtos entre duas sessões de aspiração, de aproximadamente três dias, reflete em uma recuperação de oócitos de melhor qualidade, refletindo em melhores taxas de produção de blastocistos (Blondin e Sirard, 1995). Isso ocorre porque ao realizar uma aspiração, todos os folículos presente nos ovários são removidos e reinicia-se uma nova onda folicular. A segunda sessão de aspiração ocorrendo três dias após a primeira, permite que se recupere oócitos de folículos menores sem a presença de um folículo dominante ou em dominância, o qual exerceria efeitos negativos nos folículos menores ou subordinados (Merton *et al.*, 2003). Dessa maneira, em sessões com intervalo curto é possível obter oócitos sem que tenham sofrido atresia.

Em sessões com intervalos mais longos, aumenta-se a chance de se aspirar folículos que já tenham sofrido o processo de atresia com oócitos de menor competência de desenvolvimento. Além de interferir na qualidade oocitária, o intervalo destas sessões influencia na quantidade de oócitos obtidos e ainda aumentam a ocorrência de fibrose no tecido ovariano em consequência da cicatriz causada pelas aspirações.

#### 3.3.4.7 Ambiente

A queda da fertilidade das vacas durante o verão já é relativamente bem conhecida e pode ser atribuída a sensibilidade dos ovários as elevadas temperaturas presentes nessa estação (Roth *et al.*, 2008). Outras condições ambientais também contribuem para isso, tais como, temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar, pressão atmosférica e velocidade dos ventos (Lacetera *et al.*, 2003). Todas essas variáveis podem causar estresse térmico aos animais, o qual é definido pela condição que eleva as temperaturas além da zona termoneutra dos animais (Lacetera *et al.*, 2003). Esse aumento da temperatura pode afetar a função folicular, alterando seu desenvolvimento e sua esteroidogênese, além disso, interrompe o processo de dominância e a secreção de gonadotrofinas (Roth *et al.*, 2000; Wolfenson *et al.*, 2000). Com essas modificações na fisiologia ovariana, os oócitos podem ter seu potencial de desenvolvimento reduzido. Essa redução da qualidade oocitária não afeta apenas o oócito ovulado, mas também aqueles que compõe toda a população ovariana e que também foram submetidos à exposição ao calor. No entanto, esses efeitos são reversíveis e necessitam de aproximadamente dois ou três ciclos estrais para se recuperar (Roth *et al.*, 2001).

O estresse térmico pode ser prejudicial para oócitos e embriões bovinos (Wolfenson *et al.*, 2000; Al-Katanani *et al.*, 2002). Em geral, oócitos obtidos no outono são de qualidade inferior aos obtidos no inverno (Wolfenson *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2001). Além disso, o estresse térmico também interfere no ambiente folicular, na secreção de hormônios, como LH e progesterona, que conseqüentemente alteram a qualidade do oócito (Rensis e Scaramuzzi, 2003).

#### 3.3.4.8 Estresse

Em seres humanos fatores ambientais também podem afetar a qualidade dos oócitos como, por exemplo, o estilo de vida que desencadeiam no aparecimento do estresse fisiológico. O estresse fisiológico crônico, causado pelo uso de cigarros e/ou álcool e ligados a fatores ambientais ou ocupacionais, afetam a saúde reprodutiva de mulheres prejudicando até mesmo nos resultados de fertilização *in vitro*, em função dos efeitos na qualidade dos oócitos (Lykeridou *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013).

Os eventos que causam algum tipo de estresse podem diretamente levar a uma liberação de cortisol (hormônio do estresse), que irá inibir a biossíntese de estradiol pelas células foliculares levando a uma redução tanto da quantidade quanto da qualidade dos oócitos (Ebbesen *et al.*, 2009; Kala e Nivsarkar, 2015). O consumo de álcool e cigarro, são alguns dos fatores que podem gerar a formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ruder *et al.*, 2008; Ogden *et al.*, 2009). Quando a produção de ROS ultrapassam os níveis fisiológicos há um aumento das taxas de apoptose dos oócitos e células foliculares, podendo também causar a interrupção do ciclo celular (Chaube *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2016).

### 3.4 PERCEPÇÃO E APLICAÇÃO PRÁTICA DA PIVE

A multiplicação de animais superiores há muitos anos é o objetivo de produtores. A forma de realizar essa multiplicação de maneira mais eficiente do que a monta natural é através das biotécnicas da reprodução. Com as diferentes biotécnicas é possível a utilização tanto de touros quanto de vacas de genética superior, assim como acasalamentos que permitam descendentes superiores de maneira mais eficiente. Considerando desde a mais antiga delas, a inseminação artificial, até a produção *in vitro* de embriões.

Como alternativa aos inconvenientes das biotécnicas disponíveis até então, buscou-se formas de solucioná-los. Ainda na década de 1990, alguns grupos começaram a desenvolver ferramentas de coleta de oócitos, sistemas de cultivo desses oócitos, de fertilização no laboratório e posterior cultivo dos possíveis embriões da forma mais próxima da eficiência encontrada *in vivo*, através da técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) (Kruip, 1994).

Durante alguns anos diversos trabalhos buscaram entender e desenvolver formas, protocolos e meios para as mais diversas etapas, maturação *in vitro*, capacitação espermática *in vitro*, fertilização *in vitro*, cultivo *in vitro* entre outros (Camargo *et al.*, 2006; Demyda-Peyrás *et al.*, 2015; Leroy *et al.*, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2018). O objetivo era fazer com que a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) se tornasse eficiente comparada a técnica de MOET. Uma vez que apresentasse eficiência similar a MOET e não apresentasse os problemas encontrados nessa biotécnica, teria uma grande possibilidade de aplicação comercial na pecuária (Kruip, 1994).

A técnica de produzir embriões *in vitro* inicialmente ocorria com oócitos recuperados de ovários de abatedouro. As fêmeas que comumente seriam abatidas, tinham seus ovários recuperados e estes eram levados para o laboratório. No laboratório, teria os folículos puncionados para a recuperação dos oócitos que seriam submetidos as etapas da PIVE. No entanto, oócitos coletados de animais abatidos em frigoríficos, normalmente, não são de animais de valor genético superior e portanto não são de interesse dos trabalhos de acasalamento visando o melhoramento genético (Kruip, 1994). Essa prática se tornou muito útil em pesquisas relacionadas a PIVE. E durante a década de 80 essa biotecnica se restringiu basicamente ao campo da pesquisa e com pouca utilização na indústria de embrião (Hasler, 2014).

A produção de embriões bovinos *in vitro* visando a produção de animais, necessitava de um método de coleta dos oócitos, principalmente daquelas fêmeas de alto valor genético (Faber *et al.*, 2003; Kruip, 1994) e não apenas usando oócitos oriundos de ovários coletados de frigorífico. A técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) facilitou a PIVE de animais vivos. Ainda na década de 1980, em países como Estados Unidos da América, Canadá, Alemanha, Itália, França e Holanda, surgiu alguns laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV) com intuito comercial.

Inicialmente, a técnica de OPU-PIVE era reconhecida como um complemento dos programas de superovulação e transferência de embriões, nas propriedades que já o usavam, mas que tivesse animais com algum problema relacionado a técnica de MOET. Assim, o propósito de uso da PIVE comercial seria obter embriões viáveis de fêmeas que não fossem aptas a produzir descendentes através de outras técnicas (Faber *et al.*, 2003). Animais que não respondesse aos tratamentos de superovulação ou não produzissem embriões viáveis para

transferência ou com alguma normalidade reprodutiva como, adesão ovarianas ou bloqueio das tubas ovarianas. Além disso, em animais senis ou com anormalidades adquiridas também poderia ser utilizado. Porém, uma particularidade da técnica é o uso do sêmen. A PIVE permitia a maximização do uso do sêmen, facilitando o uso de touros de alto valor comercial, incluindo sêmen sexado (Faber *et al.*, 2003).

De maneira constante diversos estudos buscaram otimizar as condições laboratoriais na tentativa de alcançar a eficiência dos embriões produzidos *in vivo*. Meios de cultivo foram por diversas vezes testados e então substituídos nas rotinas comerciais, assim como as condições de cultivo, concentração de gases (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), tipo de células para co-cultivo, ausência ou presença de células em co-cultivo, momento de avaliação dos embriões, entre outros detalhes de protocolos. No início dos anos 2000, a prioridade de uso de embriões produzidos *in vitro* ainda era de embriões frescos, uma vez que embriões criopreservados, por qualquer técnica, apresentavam resultados mais baixos de sobrevivência pós-descongelamento e conseqüentemente menores índices de prenhez comparado aos embriões frescos (Sartori *et al.*, 2016). Além da necessidade de buscar o aumento da eficiência no uso de embriões produzidos *in vitro* criopreservados, Faber *et al.*, (2003), já destacava a necessidade de buscar a redução dos efeitos *in vitro* na síndrome do bezerro grande, aumento da qualidade dos oócitos recuperados das doadoras, uso do semen sexado, injeção intracitoplasmático de espermatozoides (ICSI), e cultivo de folículos pré-antral.

Os mesmos autores ainda em 2003 já levantavam as vantagens do uso de sêmen sexado na PIVE poderiam ter aos produtores, tanto na pecuária de leite quanto de corte. Aos produtores de leite, a possibilidade de uso de sêmen sexado de fêmea, poderia eliminar ou reduzir os problemas recorrente com relação ao nascimentos de machos e os conseqüentes transtornos no manejo e reposição de plantel. Na pecuária de corte, o uso de sêmen sexado, seja de macho ou de fêmea poderia permitir o uso de acordo com a demanda de momento ou mesmo região a qual os produtores estivessem instalados. Além disso, em ambos os casos, permitiria cruzamentos entre raças e o uso de touros de alto valor zootécnico e comercial que em outras biotécnicas seriam inviáveis. Nesse sentido, a PIVE poderia ser utilizada em rebanhos comerciais para a produção de indivíduos com o objetivo de produção, seja uma vaca para a produção de leite ou mesmo um animal para produção de carne. No entanto, em função dos resultados ainda baixos nessa época, a possibilidade de uso da sexagem não

apenas do sêmen mas também de embriões não eram descartadas ou mesmo a dos fetos (Faber et al., 2003). A técnica utilizada para a sexagem embrionária era a biópsia para a retirada de alguns blastômeros e em seguida a amplificação de DNA específico do cromossomo Y pela técnica de PCR. Embora o método apresentasse um efetividade para >90% dos embriões e >95% de acurácia, os custos da produção desses embriões e também da própria técnica poderia inviabilizar a aplicação comercial de rotina da técnica. Já o sêmen sexado, em 2003 já existia uma empresa nos Estados Unidos que produzia e disponibilizava ao mercado, através da identificação de diferenças da quantidade de DNA entre os espermatozoides Y e X (Wheeler *et al.*, 2006). A ideia inicial era de aplicação dessa tecnologia em programas de inseminação artificial, MOET e PIVE. E embora incipiente, já apresentava *in vitro* resultados animadores de produção de blastocistos com sêmen sexado criopreservado.

Embora a OPU-PIVE tenha sido preconizada em animais considerados problemas para a técnica de eleição, que era a MOET, em poucos anos se tornou amplamente empregada em vacas gestantes e novilhas, incluindo animais pré-púberes (Kruip, 1994). E embora exista diferenças entre as raças de corte e leite, entre animais em lactação e secos e até mesmo influência ambiental na quantidade e qualidade dos oócitos que são recuperados, a doadora ainda é considerada a maior fonte de variação de resultados (Camargo *et al.*, 2006). Além disso, a nutrição tem papel fundamental na qualidade do oócito e também do embrião (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007; Garnsworthy *et al.*, 2008b; Sartori, Roberto, Spies e Wiltbank, 2017). A grande quantidade de fontes de variação que influenciam na eficiência dos trabalhos de PIVE, tem feito com que diversos estudos busquem alternativas de melhorar a qualidade dos oócitos e principalmente os resultados de produção de embriões (Camargo *et al.*, 2006; Lonergan *et al.*, 2006). Por conta dessas diferenças existentes o custo de produção de um embrião por OPU em vacas de leite na Europa é de 50 a 100% maior do que o custo do embrião produzido superovulação (Galli *et al.*, 2014). Esse alto custo mais as raças europeias disponíveis atualmente ainda faz com que a técnica seja aplicada em um nicho de mercado especializado. Por outro lado, a mesma técnica em outras condições, em outros países e em outro contexto permite que tenha maior êxito com relação a MOET, como por exemplo o Brasil, que se destaca pelo grande rebanho *Bos indicus* ou mestiços com um grande grau de sangue zebu (Galli *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a OPU-PIVE conseguiu uma grande expansão no Brasil pelo uso intensivo de doadoras da raça Nelore, na sua grande maioria, que em 2005 eram responsáveis por 93,8% de todos os embriões produzidos (Viana *et al.*, 2017). Outras raças zebuínas, como Brahman e Guzerá contribuíram para o crescimento do uso de embriões produzidos *in vitro* no Brasil e consequente consolidação como técnica de eleição. Parte disso em função de apresentarem grande produção de oócitos viáveis e altas taxas de blastocistos, características dos animais zebuínos (*Bos indicus*) que contribuíram para o aumento da quantidade de embriões produzidos (Pontes *et al.*, 2009; Viana *et al.*, 2012). Inicialmente, o aumento do uso de embriões *in vitro*, que apresentavam alto custo e baixa eficiência, se restringiu basicamente aos rebanhos de corte e de animais considerados elite, no qual os animais apresentavam alto mérito genético e alto valor comercial (Sartori *et al.*, 2016). Com o aumento da quantidade de embriões produzidos rapidamente, em função da melhora da eficiência do processo, a PIVE substituiu a MOET como técnica de eleição (Sartori *et al.*, 2016).

Na PIVE é possível utilizar uma quantidade menor de espermatozoides comparada as demais técnicas. Essa particularidade da técnica deixava aberta a possibilidade de utilização do sêmen sexado, seja de machos ou fêmeas. Durante anos diversos trabalhos buscaram alternativas e protocolos de separação dos espermatozoides visando a utilização na produção de embriões *in vitro*. Diversos fatores influenciam no sucesso dessa aplicação, como baixa taxa de fertilização, baixa taxa de clivagem, baixa taxa de blastocisto, baixas taxas de gestação, capacitação parcial dos espermatozoides e variação individual (Wheeler *et al.*, 2006). Por outro lado, a técnica de fertilização *in vitro* alcançou um outro nicho a partir do momento que o sêmen sexado atingiu resultados satisfatórios no laboratório (Pontes *et al.*, 2010, Viana *et al.*, 2017). E a disponibilidade do sêmen sexado no mercado com bons resultados de produção de blastocistos atraiu os produtores de leite. A possibilidade de conseguir um maior número de fêmeas nascidas na propriedade, aproximadamente 90%, resolveria um dos grandes problemas da pecuária de leite, que é o nascimento de machos, e teria vantagem econômica (Morotti *et al.*, 2014; Sartori *et al.*, 2016). Além disso, um outro fator que contribuiu para a expansão da FIV no gado de leite, foi a baixa taxa de sucesso do sêmen sexado em outras técnicas (Obuchi *et al.*, 2019), somado ao baixo custo proporcional da dose de sêmen sexado na FIV, uma vez que com uma palheta de sêmen se fecunda até 10

doadoras diferentes. Essa expansão refletiu diretamente na quantidade de embriões produzidos *in vitro* no Brasil, que passou de 137.042 em 2005 para 353.539 em 2015, sendo 57% somente de raças leiteiras (Viana *et al.*, 2017).

Assim como foi o Nelore e o Brahman no gado de corte, a raça Gir teve papel fundamental no sucesso da aplicação da técnica em gado de leite. Seguindo a lógica, animais Gir produzem muitos oócitos e apresentam boas taxas de blastocistos *in vitro* (Grázia, 2014; Pontes *et al.*, 2010), e em contrapartida não respondem bem aos protocolos tradicionais aplicados na MOET (Wohlres-Viana *et al.*, 2019). Tendo a raça Gir como grande alternativa na produção, não apenas de animais Gir, mas principalmente de animais mestiços com touros Holandês foi possível alcançar um nicho que até então considerava a técnica de PIVE como cara para ser adotada nas propriedades. Dessa forma, agora não se produzia mais somente animais considerados elites, mas também animais considerados de produção, nesse caso, com a finalidade de produção de leite nas fazendas dedicadas a pecuária leiteira. Os animais mestiços (Gir X Holandês), usualmente denominados “Girolando” independente do grau de sangue, são responsáveis por grande parte do rebanho leiteiro do Brasil. Em 2014, 79,3% do total de embriões produzidos foram de cruzamentos Gir X Holandês (Sartori *et al.*, 2016). Esses animais apresentam características interessantes diretamente relacionadas a produção como, grande quantidade de leite quando submetidos a condições de altas temperaturas, parasitas e muitas vezes pastagens pobre em nutrientes, sendo portanto, bem adaptados a regiões tropicais (Pontes *et al.*, 2010). Em função das características de produção atrativas aos produtores de leite e do aumento de produtos nascidos por FIV a partir do cruzamento Gir X Holandês, abriu a possibilidade de utilização desses animais,  $\frac{1}{2}$  sangue Gir X Holandês, também como doadoras e não somente com produtoras de leite. Esses animais mestiços F1 apresentam potencial como doadoras de oócitos e eficiência no sistema de produção *in vitro* de embriões similar ao das vacas zebuínas, independente da raça do touro doador de sêmen, Gir ou Holandês (Grázia *et al.*, 2015). Isso permite a flexibilidade da escolha do melhor grau de sangue para esses animais mestiços em função da região, manejo, nutrição e objetivos do produtor. Porém, em muitos sistemas de produção acasalar um animal F1, seja com touro Holandês ou touro Gir, pode trazer problemas. Aumentando a vulnerabilidade quando os produtos possuem maior porcentagem de sangue taurino, ou redução da produção quando possuem maior porcentagem de sangue zebu. Uma outra alternativa é transferir embriões F1

nesses animais F1, as utilizando como receptoras e assim mantendo sempre um rebanho de animais F1 (Sánchez *et al.*, 2015). A possibilidade do uso de sêmen sexado de fêmea, bons resultados de animais da raça Gir na PIVE, um grande mercado para animais  $\frac{1}{2}$  sangue Girolando e bons resultados desses animais também na PIVE permitiu um aumento do uso da técnica, atingindo um outro nicho.

Até os dias atuais, a maior parte dos embriões produzidos por FIV, principalmente no Brasil, ainda são de raças leiteiras, sendo 57,2% (Viana *et al.*, 2017). No entanto, considerando o grande número de animais do rebanho brasileiro, estimado em 213.500.00 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2018), sendo em sua grande maioria animais considerados comerciais e da raça Nelore (Pontes *et al.*, 2011), os quais não possuem o registro de genealogia, ainda existe um grande mercado que a técnica pode atingir. Para isso existem alguns grandes desafios, como custos de produção, de forma que torne a técnica mais competitiva com a técnica de eleição atual nesses rebanhos, a IATF, desafios de logística, resultados mais consistentes com embriões criopreservados, preocupação com a qualidade dos oócitos e consequentemente dos embriões, e principalmente, resultados de gestação satisfatórios e constantes e redução das perdas após 30 dias de gestação (Blondin, 2017).

Apesar de todos os desafios, o mercado de animais para produção de carne é um nicho que pode expandir a produção *in vitro* de embriões. Existindo duas possíveis aplicações da técnica nesse mercado. Aplicação na reposição de fêmeas, seguindo a mesma lógica do início do uso comercial da PIVE. No início dos anos 2000, a necessidade seria para a produção de tourinhos, já agora, a possibilidade é para a produção de matrizes para reposição no rebanho. E, principalmente para produção de animais F1 (*Bos indicus* X *Bos taurus*) utilizando ooócitos de animais da raça Nelore e sêmen de touros de raças taurinas. A raça Nelore, além de ser resistente ao clima tropical, produz grande quantidade de oócitos, boa eficiência na PIVE e compõe grande parte do rebanho brasileiro (Pontes *et al.*, 2011; Sartori *et al.*, 2016). Essas características da raça aliada a grande disponibilidade de fêmeas Nelore podem minimizar alguns desafios dos trabalhos de grande escala, como por exemplo o uso de ovários coletados em abatedouro como fonte de oócitos.

### 3.5 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL E REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA

O desenvolvimento embrionário inicial, no período pré-implantação, é relativamente bem conservado entre as espécies de mamíferos. É um período considerado curto quando comparado com a duração da gestação em muitas espécies como, por exemplo, nos bovinos (Corry *et al.*, 2009). Mesmo durando poucos dias, nesse período ocorrem eventos importantes e críticos para o desenvolvimento posterior (Cantone e Fisher, 2013). Após a fertilização, uma complexa maquinaria molecular coordena as divisões celulares e a diferenciação dessas células nos mais diversos tipos celulares encontrados no indivíduo adulto. Além disso, coordena a ativação do genoma embrionário ou a transição materno-zigótica e a compactação celular que ocorre no estágio de mórula. Todas essas características do desenvolvimento embrionário inicial são essenciais para seu progresso (Schultz, 2002; Garcia *et al.*, 2015). Essa complexa maquinaria que coordena o desenvolvimento e a diferenciação celular é composta por um complexo mecanismo epigenético que essencialmente controla a expressão gênica. Alguns desses mecanismos são bem conhecidos (metilação do DNA), enquanto outros são menos conhecidos (*Imprintig* e inativação do cromossomo X) e alguns ainda estão sendo investigados a fim de serem melhor compreendidos (Okano *et al.*, 1999; Reik e Walter, 2001; Heard e Disteche, 2006; Kaikkonen, 2011).

Além do material genético, todas as células apresentam esses mecanismos epigenéticos (Ross e Canovas, 2016). No entanto, em dois momentos ocorrem o que é denominado como reprogramação epigenética. Essa reprogramação ocorre nas células germinativas primordiais que darão origem aos gametas, e no período embrionário inicial (Cantone e Fisher, 2013). Ela é responsável por apagar ou reiniciar as características epigenéticas das células e permite que as células germinativas, inicialmente com características de uma célula somática, reorganizem o seu padrão de expressão gênica e retomem a totipotência formando os gametas, masculino ou feminino. Já durante o período embrionário inicial, a reprogramação permite que haja um novo padrão de expressão dos genes, dando origem a um novo indivíduo com características únicas (Messerschmidt *et al.*, 2014). Esses dois momentos são extremamente importantes para o desenvolvimento e sensíveis a perturbações externas, podendo ocasionar diversos fenótipos no indivíduo por alteração das características epigenéticas (Reik, 2001).

Levando em consideração que a manipulação exigida nas biotécnicas da reprodução, com gametas e embriões, concide com esse período, e ainda geram ambientes abaixo do ideal para o desenvolvimento potencialmente pode ocorrer uma regulação genica aberrante (Sirard, 2017). Apesar da evidente evolução nos protocolos de PIVE utilizados comercialmente, alguns pontos ainda merecem atenção, principalmente a luz da regulação epigenética. O objetivo dessa revisão é abordar alguns aspectos do desenvolvimento embrionário inicial e sua relação com a epigenética, especificamente a reprogramação epigenética que ocorrerá nesse período.

### 3.5.1 Desenvolvimento embrionário inicial

Em mamíferos, uma série de divisões celulares altamente coordenadas transforma o oócito fertilizado, ou zigoto (embrião de uma célula) em um blastocisto competente para a implantação com duas linhagens celulares distintas, trofoectoderma e massa celular interna. Para isso acontecer, dois processos sequenciais devem ocorrer: a maturação do oócito e divisões celulares após a fertilização. A maturação do oócito ocorre nos próprios folículos ovarianos, processo esse que em algumas espécies já é possível ser feita *in vitro*. Durante o crescimento do feto, alguns oócitos imaturos, ou oôgonias, escapam do ciclo mitótico e entram em meiose após replicar seu DNA. Essas células, conhecidas como oócitos primários, contém 4N de material genético que permanece retido na etapa de prófase da primeira divisão meiótica. Em resposta aos sinais hormonais, folículos maduros e oócitos primários sofrem maturação nuclear, caracterizada pela quebra da vesícula germinativa e pela retomada da primeira divisão meiótica. Como resultado desta primeira divisão meiótica é produzido um oócito secundário com ploidia igual a 2N e o primeiro corpúsculo polar, com posterior ovulação e liberação do oócito. Em sequência, a segunda divisão meiótica é iniciada e o oócito fica retido em metáfase (metáfase II) até que ocorra a fertilização (Corry *et al.*, 2009).

A fertilização ocorrerá nas tubas uterinas e após a união com um espermatozoide, o oócito maturado acionará a maquinaria para completar a segunda meiose e liberar o segundo corpúsculo polar. Forma-se então o zigoto com os dois pró-núcleos, masculino e feminino, caracterizado pelos cromossomos descondensados e envoltos por uma membrana. Para o início da primeira divisão celular, é necessário que ocorra a singamia, que é a união desses

pró-núcleos, que contém material genético materno e paterno, e consequente formação do núcleo do recém-formado embrião (Wassarman *et al.*, 1999; Corry *et al.*, 2009).

Após a fertilização ocorrerá as divisões celulares formando um embrião de duas células, seguido de sucessivas divisões mitóticas reducionais das células (clivagem) formando então 4, 8, e 16 células, nas quais as células vão se multiplicando e progressivamente reduzindo o citoplasma até alcançar o estágio de blastocisto, o qual romperá posteriormente a zona pelúcida para se fixar ao tecido uterino. Esse período pré-implantação varia pouco entre as espécies, em camundongos o tempo da fertilização até a implantação é de aproximadamente 4,5 dias, enquanto em humanos e bovinos este período é de aproximadamente uma semana (Corry *et al.*, 2009).

O desenvolvimento embrionário em mamíferos apresenta dois momentos característicos e importantes, que são: a transição materno-zigótica (TMZ) ou ativação do genoma embrionário, e a compactação. O primeiro ocorre entre os estádios de 8-16 células, na espécie bovina, sendo uma das etapas mais críticas do período de pré-implantação. Na biotécnica de produção *in vitro* de embriões essa etapa é reconhecidamente a mais crítica, na qual cerca de 50% dos embriões cessam seu desenvolvimento por não conseguirem realizar a ativação do seu genoma de forma eficiente (Garcia *et al.*, 2015). Já a compactação ocorre em um estágio posterior de desenvolvimento, quando o embrião alcança a fase de mórula. Em geral, os oócitos contém uma grande quantidade e variedade de RNA's que os auxilia nas etapas de maturação e fertilização (Stitzel e Seydoux, 2007). Ao longo dos diferentes estádios, estes RNA's associados a cada etapa são degradados permitindo então que o genoma do zigoto possa progressivamente cumprir as exigências do embrião em desenvolvimento (Schier, 2007). Essa transição materno-zigótica ocorre basicamente em três etapas: 1) degradação dos transcritos maternos; 2) substituição dos transcritos materno, comum nos oócitos e embrião inicial, por transcritos expressos pelo próprio zigoto e; 3) hiper regulação dos genes específicos do zigoto que irão reiniciar e reprogramar o padrão de expressão gênica do embrião em desenvolvimento (Schultz, 2002). Nessa fase ainda, ocorre um outro período, o início da diferenciação celular em função da distribuição espacial das células no embrião, no qual a posição tridimensional das células embrionárias, ou blastômeros, no embrião é diferente (Yamanaka *et al.*, 2006).

Na etapa seguinte o embrião é denominado mórula, e já não é mais possível contar suas células, mas já pode-se notar células mais externas, organizadas próximas a zona pelúcida e células mais internas, compondo a futura massa celular interna, fazendo com que a distribuição de moléculas sinalizadoras alcance de forma diferente as células. A etapa imediatamente seguinte é denominada mórula compacta, caracterizada pela maior compactação das células. Isso ocorre em decorrência do surgimento de uma maior quantidade de junções comunicantes, ocorrendo também a presença de mudanças bioquímicas. Essas mudanças possibilitam que os blastômeros apresentem características similares às células somáticas como transporte de íons, metabolismo, arquitetura celular e padrão de expressão gênica (Fleming *et al.*, 2001; Kidder e Wintherhager, 2001). Com a compactação, ocorrerão divisões celulares que direcionarão algumas células para que elas fiquem mais no interior da massa de células que compõe a mórula. Essas células mais internas darão origem a massa celular interna (MCI), enquanto as células mais externas darão origem ao trofoectoderma (TE) (Yamanaka *et al.*, 2006). Essa camada mais externa (TE) se tornará um epitélio responsável por transportar fluido e por formar uma cavidade, essencial para a sequência do desenvolvimento e diferenciação (Watson *et al.*, 1990).

A etapa seguinte do desenvolvimento caracteriza-se pela formação do blastocisto, que apresenta uma cavidade preenchida por líquido, denominada de blastocele. A diferenciação principal ocorre nesse estágio, e é possível observar a presença de uma cavidade com duas populações celulares bem distintas, a MCI, da qual o embrião propriamente dito é formado a partir dos três folhetos embrionários e o TE, que dará origem aos tecidos extraembrionários. Nessa fase já há diferença de expressão gênica entre esses dois grupos celulares (Pesce e Scholer, 2001; Yamanaka *et al.*, 2006). O primeiro desses estágios é o blastocisto inicial, que apresenta uma pequena cavidade. Nesse estágio se inicia de forma mais clara a formação de duas populações de células distintas no embrião. Os estágios seguintes se caracterizam basicamente pelo aumento dessa cavidade e a completa formação das duas populações celulares. O blastocisto é a etapa seguinte, na qual aproximadamente metade do embrião é preenchida por células e a outra metade por líquido. A medida que a quantidade de líquido aumenta, aumenta a cavidade e o embrião passa a ser classificado como blastocisto expandido, sendo possível distinguir as células trofoblásticas das células do embrioblasto, que irão originar o feto a partir dos três folhetos embrionários, ectoderma, mesoderma e

endoderma. Essas duas populações celulares são fenotipicamente distintas e com funções bastante diferente entre elas. Até esse momento ambas as populações ainda estão dentro da zona pelúcida, uma camada amorfa oriunda do oócito. No entanto, para continuar o desenvolvimento embrionário é necessário que a zona pelúcida se rompa e que o embrião, composto de trofoblasto e embrioblasto, possa ter contato com o endométrio uterino (Watson, 1992). Esse estágio é denominado de blastocisto eclodido, e caracteriza-se pelo rompimento da zona pelúcida e liberação do embrião. A partir desse momento, o embrião irá iniciar a implantação no útero, por meio das células do seu trofoblasto (Yamanaka *et al.*, 2006).

### 3.5.2 Programação e reprogramação epigenética

Segundo definição do dicionário médico Dorland, genética é o estudo dos genes, sua estrutura e função molecular e sua natureza química e física. O termo epigenética definido como acima da genética (EPI- prefixo grego que significa acima), foi cunhado pela primeira vez por Conrad Waddington na década de 1940 e se refere as interações entre genes e seus produtos que se manifestam como um fenótipo (Waddington, 2012). Do ponto de vista molecular, reguladores epigenéticos incluem modificações no DNA sem que haja alteração em sua sequência ou alterações nas histonas e RNA's não codificantes (ncRNA). Outros reguladores durante a diferenciação celular são o *imprinting*, a inativação do cromossomo X e o silenciamento por transposon (Jaenisch e Bird, 2003).

Em todas as células dos organismos eucarióticos, além do material genético (DNA) há também um complexo mecanismo epigenético que controla o padrão de expressão gênico. Nas células germinativas e no embrião ainda em fase de pré-implantação, ocorrem diversos mecanismos epigenéticos que coordenam o desenvolvimento normal e a diferenciação. A simplicidade das mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial, como o processo de clivagem, contrasta com a complexidade dos eventos moleculares que remodelam a cromatina do epigenoma embrionário durante esse período (Ross e Canovas, 2016). Nos organismos adultos as células estão comprometidas com funções altamente especializadas ou então reside no *pool* de células tronco que a grande maioria dos tecidos apresentam, porém apresentam um potencial de desenvolvimento limitado. Embora todas as células contenham o mesmo material genético, cada tipo celular é

definido por um padrão específico de expressão gênica que as diferenciam. Durante o desenvolvimento embrionário células inicialmente totipotentes passam por vários processos de diferenciação. Esses processos são, controlados por diversos mecanismos como a sinalização e a posição celular, além de fatores epigenéticos que irão definir a diferenciação dos vários tipos celulares (Messerschmidt *et al.*, 2014). Os mecanismos que controlam a capacidade de gerar a grande variedade de tipos celulares distintos consistem na programação epigenética. Por outro lado, durante a formação das células germinativas primordiais (CGP) e no desenvolvimento embrionário pré-implantação, as características epigenética é alterada de forma global, denominada de reprogramação epigenética (Cantone e Fisher, 2013).

Os fatores epigenéticos podem ser considerados como um obstáculo para reprodução sexuada entre dois indivíduos adultos. A preparação para uma nova geração necessita retornar o epigenoma ao básico, voltando ao estado totipotente e assim permitir que um novo indivíduo se forme sem nenhuma ou com a menor quantidade possível de marcas no epigenoma vindo dos parentais. Essa preparação ocorre basicamente através de três etapas. A primeira é a deleção das marcas nas células somáticas precursoras das células germinativas, a segunda é por meio de um mecanismo de reprogramação, estabelecendo marcas epigenéticas sexo-específicas nas células germinativas. E por fim, a última etapa é a remoção pós-fertilização dessas marcas para permitir o desenvolvimento embrionário e início de um novo ciclo celular (Messerschmidt *et al.*, 2014). Isso ocorre porque os gametas são produzidos a partir de células somáticas que sofreram diferenciação durante a embriogênese até se tornarem uma célula haploide com competência para se diferenciar em todas as células de um novo indivíduo (Snell e White, 1996; Wassarman *et al.*, 1999) . Tanto o genoma do macho quanto o da fêmea sofre diversas mudanças epigenéticas durante a espermatogênese, foliculogênese e oôgenese. Por fim, quando ocorre a fusão dos gametas, conhecida como singamia, uma nova onda de alterações epigenéticas necessita acontecer para um novo indivíduo diploide adquirir um estado transcricional que irá coordenar o seu desenvolvimento (Rivera, 2010).

A informação epigenética é estável, sendo possível ser herdada de célula para célula, mesmo após diversas mitoses. Mas também tem caráter flexível, o que significa que pode ser modificada, como ocorre durante a diferenciação celular, na qual diferentes genes são ativados e silenciados. O momento que essa plasticidade epigenética máxima ocorre é

durante a formação das células germinativas e no desenvolvimento embrionário inicial, quando a reprogramação epigenética se faz necessária (Reik *et al.*, 2001; Li, 2002; Dean *et al.*, 2003; Wrenzycki *et al.*, 2005; Sasaki e Matsui, 2008; Cantone e Fisher, 2013). Essa reprogramação é considerada importante para “resetar” a configuração epigenética do genoma dos gametas e das células totipotentes embrionárias. Dessa maneira, permite a expressão gênica do embrião que irá regular o desenvolvimento do novo indivíduo. Somado a isso, essa reinicialização pode ser importante para prevenir a transmissão de alterações epigenéticas adquiridas durante a vida dos parentais para a próxima geração (Ross e Canovas, 2016). Durante a gametogênese e o período pré-implantação o epigenoma dos mamíferos é dinamicamente remodelado, incluindo mudanças drásticas na metilação do DNA de todo o genoma e modificações de histona (Reik *et al.*, 2001; Li, 2002; Dean *et al.*, 2003; Wrenzycki *et al.*, 2005; Sasaki e Matsui, 2008; Cantone e Fisher, 2013). A metilação global do DNA é apagada através de oxidação ativa, e conseqüentemente transformada em DNA hidroximetilada, e/ou durante a divisão celular, por perda passiva de marcações de metilação no momento da replicação, ocasionada pela ausência da manutenção da metilação (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002; Inoue e Zhang, 2011; Iqbal *et al.*, 2011; Wossidlo *et al.*, 2011).

A natureza regulatória dos mecanismos epigenéticos e sua alta atividade no período embrionário indica que os embriões podem ser sensíveis ao ambiente e adaptá-los. A influência das condições ambientais pode acarretar em fenótipos indesejáveis e patologias, mas também permite a possibilidade do aumento da produção animal ao usar a seleção epigenômica, embora ainda apresente enormes desafios e grandes oportunidades para pesquisadores (Ross e Canovas, 2016). Enquanto novos mecanismos epigenéticos estão sendo ainda conhecidos, alguns já são bem caracterizados, como a metilação do DNA, mudanças nas proteínas das histonas (nas quais o DNA é empacotado) e a expressão de RNA's não codificantes (Perera e Herbstman, 2011). Há também a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico, que serão melhor explicados abaixo. Esses mecanismos são normalmente descritos como independentes, no entanto, existe uma relação entre os diferentes tipos de processos epigenéticos que irão regular o epigenoma (Weber *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2009). Essa interação entre esses diversos mecanismos epigenéticos já conhecidos que geram a diversidade de tipos celulares durante o desenvolvimento e mantém

o perfil de expressão dos diferentes tipos celulares durante toda a vida (Reamon-Buettner e Borlak, 2007). No entanto, qualquer perturbação no funcionamento normal desses mecanismos pode gerar consequências em qualquer fase da vida, embrionária, fetal e mesmo pós natal.

### 3.5.3 Tipos de modificações epigenéticas

#### 3.5.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação epigenética essencial para o desenvolvimento normal dos mamíferos e uma das primeiras a ser conhecida (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999). Esse mecanismo está normalmente associado ao silenciamento de genes, que ocorre através da ligação de proteínas ligadoras de DNA sensíveis a metilação e também pela interação com modificações das proteínas conhecidas como histonas. Essas alterações irão modular o acesso da maquinaria de transcrição aos promotores gênicos e consequentemente interferir na transcrição desses genes (Lande-Diner *et al.*, 2007).

Em resumo, a metilação ocorre pela transferência do grupo metil para o quinto carbono do resíduo de citosina na fita de DNA (Lande-Diner *et al.*, 2007). A grande maioria das metilações de DNA em mamíferos ocorre em dinucleotídeos CpG (Ibrahim *et al.*, 2006; Ziller *et al.*, 2011). Esses CpG estão distribuídos de forma não aleatória no genoma, formando o que se chama de ilhas CpG. Nessas regiões genômicas se encontram a maior concentração dessas ilhas que podem variar de 200 pares de base (bp) até muitos kilobases. As ilhas CpG que são em geral não metiladas, se localizam tipicamente dentro do promotor gênico de genes que necessitam ser ativamente expressos, como por exemplo, genes de manutenção e supressores de tumor (Bird, 2002). Em contraste, ilhas CpG de genes que devem ser mantidos silenciados são predominantemente metilados (Okano *et al.*, 1999).

Algumas proteínas relacionadas a metilação são importantes para o desenvolvimento embrionário normal, tais como as DNA metiltransferases, que podem estabilizar ou manter os padrões de metilações do DNA (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999). Essas moléculas pertencem a uma família de proteínas denominadas DNMT, mais especificamente DNMT3a, que apresentam papel importante na manutenção do padrão de metilação durante a replicação, na metilação *de novo* e também durante o estabelecimento da metilação alelo-

específica no *imprinting* (Bourc'his *et al.*, 2001; Howell *et al.*, 2001; Maunakea *et al.*, 2010). No entanto, o processo inverso, de demetilação, também é crítico durante o desenvolvimento das CGP e do embrião inicial. Esse processo pode ocorrer de forma ativa ou passiva. De maneira geral, a forma passiva ocorre durante a divisão celular, enquanto a forma ativa utiliza um mecanismo de reparo de excisão. Nessa via é necessário a hidroxilação da 5-metilcitosina para 5-hidroximetilcitosina por duas enzimas, TET1 e TET2, seguido da desaminação pela AID e APOBEC1, antes do reparo de excisão de base ou nucleotídeo (Cedar e Bergman, 2012).

### 3.5.3.2 Modificações de Histonas

Histonas são compostas de um octâmero de proteínas, H2A, H2B, H3 e H4, estando cada tipo presente em duplicata. Ao redor desse núcleo de proteínas, se enrola a fita de DNA, o qual confere estabilidade estrutural e também regula a expressão gênica. Essa estrutura proteica forma um núcleo, o qual apresenta um domínio globular e uma cauda N-terminal altamente dinâmica que se projeta para fora desse domínio globular (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). Essa cauda das histonas pode apresentar um grande número de modificações pós-traducionais que incluem: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, isomerização da prolina, citrulinação, butirilação, propionilação e glicosilação (Gardner *et al.*, 2011). Essas diferentes modificações presentes nas histonas podem estar relacionadas com a cromatina ativa ou reprimida, e influenciando consequentemente na transcrição de genes. Diferentes estados da cromatina ocorrem em diferentes regiões promotoras de genes, facilitando mudanças rápidas de expressão. Além disso, está presente durante o desenvolvimento inicial, quando ocorre os processos de diferenciação e especificação (Cedar e Bergman, 2012; The ENCODE Project Consortium, 2012).

### 3.5.3.3 RNA's não codificantes

Os RNA's não codificantes (ncRNA) apresentam função importante no controle epigenético da expressão. Esses RNA's são classificados de acordo com seu tamanho e função e representam uma grande parte da transcrição que ocorre no DNA genômico das

células quando comparadas a quantidade de transcritos que codificam proteínas (Djebali *et al.*, 2012; The ENCODE Project Consortium, 2012). Os ncRNA's incluem pequenos RNA de interferência (siRNAs), micro RNA (miRNA) e longos RNA não codificantes (lncRNAs) que apresentam função importante na regulação da expressão gênica durante a transcrição, degradação de RNA mensageiro (mRNA), splicing e tradução (Kaikkonen *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que a expressão de miRNA e lncRNA em blastocistos humanos esta correlacionado com a manutenção da pluripotência durante o desenvolvimento embrionário e na regulação da expressão gênica de algumas linhagens celulares específicas (Mohamed *et al.*, 2010; Rosenbluth *et al.*, 2013). Alguns tipos de lncRNA apresentam conservação entre espécies e possuem função importante no processo de desenvolvimento como, por exemplo, a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico (Ponting *et al.*, 2009).

#### 3.5.3.4 Inativação do cromossomo X

Em muitas espécies de mamíferos, machos e fêmeas apresentam cromossomos sexuais diferentes, com os machos apresentando de maneira geral cromossomos XY e as fêmeas XX. Como forma de compensar o desbalanço da dosagem de genes ligado ao cromossomo X, as fêmeas silenciam um dos dois cromossomos X, processo conhecido como inativação do cromossomo X (Heard e Distech, 2006). Esse processo é uma forma especializada de regulação epigenética essencial para o controle da expressão gênica.

Os embriões contendo mais de um cromossomo X sofrem inativação aleatória do cromossomo X no estágio de blastocisto durante a embriogênese inicial (Pessia *et al.*, 2012). Essa inativação é regulada por um *locus* principal no cromossomo, conhecido como centro de inativação do X (XIC) que ainda não é totalmente compreendido, mas se sabe que cada célula diploide fica restrita a somente uma cópia ativa do cromossomo X. Esse processo envolve a hipacetilação das histonas H3 e H4, metilação da lisina 27 na histona H3 e metilação do DNA em promotores rico em CpG (Okamoto e Heard, 2009; Morey e Avner, 2011).

#### 3.5.3.5 *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico é um processo pelo qual as linhagens germinativas do macho ou da fêmea confere marcas específicas ou *imprintings* para certas regiões cromossômicas (Reik e Walter, 2001). Essas marcas são sexo-especifica. Esse *imprinting* causa a expressão

monoalélica específica de origem parental (macho ou fêmea) em certos momentos do desenvolvimento ou em certos tipos celulares.

A expressão de genes imprintados é dependente de um número relativo de alelos parental-específico e necessita também de contribuições de outros alelos de ambos os parentais, embora a expressão seja monoalélica ligada a um dos parentais. Isso significa que alterando o número ou a proporção de alelos parentais ocorrerá uma desregulação do *imprinting*. A consequência dessa desregulação em fetos que apresentam contribuição genômica apenas materna ou paterna, é o aparecimento de uma série de patologias como, por exemplo, o teratoma ovariano cístico maduro (MCT), quando apresenta apenas cromossomos derivados da mãe. Nesse caso, o conceito apresenta sérios problemas biológicos como consequência da herança uniparental (Mutter, 1997). A grande maioria dos genes autossômicos são normalmente expressos de alelos paternos e maternos, enquanto genes imprintados são exclusivamente expressos do alelo paterno ou materno de maneira específica de origem parental, ou seja, um gene expresso do alelo paterno tem a cópia materna silenciada, da mesma forma que um gene expresso do alelo materno tem a sua cópia paterna silenciada (Choufani *et al.*, 2010). Alguns estudos já demonstraram a importância desses genes no desenvolvimento embrionário, fetal, da placenta e até mesmo do sistema nervoso do indivíduo (Tycko e Morison, 2002; Weksberg, 2010).

De maneira geral, genes imprintados são encontrados agrupados formando domínios imprintados. Em estudos com humanos, esses domínios já são conhecidos em alguns cromossomos, como o 6, 7, 11, 14, 15 e o 20 (Weksberg, 2010; Choufani *et al.*, 2011). A regulação desses domínios é realizada pelo centro de *imprinting* (ICs), que são caracterizados pela presença de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

#### 3.5.4 Reprogramação epigenética das células germinativas primordiais

A remoção das marcas de todo genoma e a reprogramação epigenética se inicia nas células germinativas primordiais. O sexo do embrião em desenvolvimento irá determinar qual gameta irá se desenvolver, espermatozoides ou oócitos a partir dessas células primordiais. Essa diferenciação sexo-específica inclui o estabelecimento de *imprinting* específico de origem parental (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). Usando o camundongo como modelo animal,

foi demonstrado que a migração das CGP se inicia por volta do dia 8,5 do desenvolvimento, alcançando o local das futuras gônadas no dia 11,5 (McLaren, 2003). A partir de então, se inicia a demetilação dessas células que termina por volta do dia 13,5 (Feng *et al.*, 2010). Essa demetilação é global e apenas 7% das ilhas CpGs permanecem metiladas, número bastante baixo quando comparado com as células tronco embrionária (70%) e com as células somáticas (80%) (Popp *et al.*, 2010). Uma pequena diferença no momento que ocorre esses processos existe entre os gametas de embriões machos e fêmeas. A espermatogênese ocorre na fase pré-natal e a metilação do DNA paterno-específica é completado ao nascimento. Por outro lado, a reprogramação epigenética dos oócitos ocorre muito mais tarde do que nos espermatozoides, se iniciando na puberdade e se completando próximo ao momento da ovulação (Saitou *et al.*, 2012).

### 3.5.5 Reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário inicial

A reprogramação epigenética nos embriões em estádios iniciais é extremamente importante para o desenvolvimento normal de um novo indivíduo. Embora muitos trabalhos destaquem os padrões de metilação do DNA, outros dois mecanismos de controle epigenéticos também possuem papel importante nesse processo, sendo eles as modificações de histona e as alterações por RNA's não codificantes (Hales *et al.*, 2011).

Antes de ocorrer a fertilização, o espermatozoide e o oócito são altamente especializados, diferindo na sua expressão gênica em função do padrão de metilação do DNA e também pela organização da cromatina, a qual no espermatozoide se apresenta com o DNA altamente condensado por proteínas especiais, conhecidas como protaminas. Após a fertilização, o desenvolvimento embrionário inicia com a descondensação do genoma paterno dessas protaminas e a sua substituição por histonas de origem materna (Morgan *et al.*, 2005). Um mecanismo que facilita a abertura da histona e sua substituição é a hiperacetilação da H4 (Santos *et al.*, 2002). Em seguida, o genoma paterno sofre uma rápida demetilação (Santos *et al.*, 2002b; Hales *et al.*, 2011) e nessa fase é clara a assimetria epigenética que existe entre os parentais, no qual pode-se observar que a cromatina materna é rica em histonas metiladas, como metilação da lisina 4 da histona H3, enquanto na cromatina paterna há histonas hipometilada (Lepikhov e Walter, 2004; Van Der Heijden *et al.*, 2006). A demetilação do genoma materno ocorre em seguida, e aproximadamente no estágio de 4 células do embrião,

a demetilação dos dois genomas é equalizada (Hales *et al.*, 2011). Algumas marcas epigenéticas, como genes imprintados, são protegidos por proteínas específicas durante o desenvolvimento embrionário no período pré-implantação (Feng *et al.*, 2010). No estágio de blastocisto ocorre uma nova assimetria epigenética com relação a metilação das histonas. Essas modificações regulam fatores de transcrição que, em parte, são responsáveis pela diferenciação das duas populações de células embrionárias, o TE e a MCI (O'Neill *et al.*, 2006; Vermilyea *et al.*, 2009).

Durante as primeiras divisões celulares, as células filhas originadas do zigoto herdam o genoma reprogramado com baixa metilação e são difíceis de diferenciar com base nos parâmetros epigenéticos. No estágio de mórula ocorre a primeira diferenciação entre células; sendo as células mais periféricas destinadas a formar os tecidos extraembrionários e as mais internas a formar o embrião propriamente dito (Johnson e Ziomek, 1981). No estágio seguinte, blastocisto, já ocorrem diferenças epigenéticas entre essas duas populações celulares, sendo inclusive, possível identifica-las por técnicas moleculares (Santos *et al.*, 2002b). As células do trofoectoderma (TE) possuem baixos níveis de metilação do DNA enquanto as da massa celular interna (MCI) já apresenta o restabelecimento da metilação.

Durante o desenvolvimento inicial, ncRNA's também apresentam funções importantes. Uma grande quantidade e diversidade de tipos de RNA's estão presentes no oócito maduro (Watanabe *et al.*, 2008; Ohnishi *et al.*, 2010). No estudo de Ohnishi e colaboradores (2010) foi demonstrado que os diversos tipos de RNA apresentam uma dinâmica durante o período pré-implantação, os diferentes tipos dessa molécula podem aumentar, diminuir ou não ter a quantidade alterada. No momento da transição materno-zigótica é necessário a degradação dos transcritos maternos e a iniciação da transcrição zigótica. Essa degradação ocorre tanto nos RNA mensageiros quanto nos pequenos RNA's. No entanto, essa degradação ocorre em períodos diferentes do desenvolvimento entre os diferentes tipos de RNA's (Yang *et al.*, 2008). Um tipo específico de RNA, o miRNA, apresenta aumento com a progressão do desenvolvimento. Possivelmente, esse aumento ocorre em função do aumento dos miRNA's estadio-específico que estão envolvidos na transcrição de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (Yang *et al.*, 2008; Viswanathan *et al.*, 2009; Ohnishi *et al.*, 2010). Ainda, um tipo de RNA não codificante apresenta papel importante durante as divisões celulares, que é a inativação do cromossomo

X nos embriões fêmeas (Keverne, 2009). Todas essas alterações durante o desenvolvimento inicial permite que o epigenoma se estabeleça no novo indivíduo (Hales *et al.*, 2011).

### 3.5.6 Desregulação epigenética: Possíveis consequências

Em 1942, quando Conrad Waddington definiu o termo epigenética, descreveu que a forma de vida de um organismo pode fazer com que seus genes se expressem de forma diferente, ou seja, o ambiente influencia a expressão gênica (Ferreira e Franco, 2012). Durante toda a vida de um indivíduo podem ocorrer alterações epigenéticas, sendo essas até mesmo herdáveis para as próximas gerações (Reik, 2007; Whitelaw e Whitelaw, 2008).

O desenvolvimento dos mamíferos se inicia com um zigoto totipotente, que tem potencial de desenvolvimento para gerar um organismo inteiro com toda a variedade celular. Esse estado totipotente não é definido por um único complemento genético, quase sem exceção, todas as células descendentes desse zigoto compartilham a sequência exata de DNA apesar de ter uma capacidade de desenvolvimento diferente e restrita (Seisenberger *et al.*, 2017).

Dentro de epigenômica, sinais moleculares são responsáveis por estabelecer a expressão correta de genes específicos do embrião, principalmente durante a gametogênese e embriogênese (Golbabapour *et al.*, 2011). Essa reprogramação ocorre em dois momentos primordiais, primeiro nas CGP durante a gametogênese, e posteriormente a fertilização, na embriogênese inicial (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). Essa reprogramação se torna importante uma vez que, as mudanças dramáticas que ocorre no status epigenético permite o zigoto apagar o padrão epigenético herdado dos gametas, com exceção do *imprinting* parental, e assim recuperar a totipotência. Da mesma forma, essa reprogramação das CGP está associada com a restauração do potencial de desenvolvimento e a deleção dos *imprintings* parental. Isso se torna importante nessas células, pois elas têm origem no epiblasto do embrião, uma camada celular com alta capacidade de desenvolvimento, porém que dará origem as células somáticas do indivíduo, necessitando de uma reprogramação para recuperar essa capacidade de célula germinativa (Seisenberger *et al.*, 2017).

Os diversos mecanismos epigenéticos já conhecidos são de extrema importância para que ocorra o desenvolvimento normal, desde a formação dos gametas até o nascimento do

novo indivíduo formado por reprodução sexuada. No entanto, falhas nesses mecanismos podem ocorrer durante todo o desenvolvimento, seja espontaneamente ou influenciada pelo ambiente. O período do desenvolvimento embrionário inicial é crítico com relação a susceptibilidade a desregulação epigenética, como já foi demonstrado em trabalhos com crianças nascidas após o uso das técnicas de reprodução assistida, que apresentaram alterações epigenéticas (Eroglu e Layman, 2012; Hiura *et al.*, 2012). Em outros estudos foi demonstrado que mesmo durante a gestação essas alterações epigenéticas podem ocorrer, principalmente em situações nas quais as crianças nasceram de mães que passaram por momentos de privação alimentar durante o primeiro trimestre gestacional (Heijmans *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Tobi *et al.*, 2012).

Fatores ambientais podem alterar os marcadores epigenéticos, impactando não apenas no desenvolvimento do embrião, mas também das próximas gerações. Fatores nutricionais, medicamentos e poluentes ambientais podem alterar o perfil epigenético (Reik *et al.*, 2001). Um exemplo documentado e histórico são os estudos das crianças nascidas de mães que passaram fome durante a gestação. Esse estudo permitiu a descoberta de modificações epigenéticas influenciadas pelo ambiente pré-natal (Heijmans *et al.*, 2008, 2009; Huang *et al.*, 2010; Tobi *et al.*, 2012). Esses fatores desencadeiam diversos problemas, tais como, alto índice de massa corporal, elevadas concentrações lipídicas no plasma, aumento do risco de esquizofrenia e possíveis doenças cardiovasculares, além de outros fenótipos pós-natais (Susser *et al.*, 1999; Painter *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

### 3.6 ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS PÓS NATAIS ASSOCIADAS AO USO DA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

As primeiras evidências dos mecanismos epigenéticos surgiram na época da Segunda Guerra Mundial a partir da observação de crianças nascidas de mães que haviam sofrido privação alimentar. Essas crianças apresentavam fenótipos incomuns para época, como resistência a insulina e problemas cardiovasculares (Xu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Desde então, principalmente na medicina humana, aumentou-se o interesse acerca dos efeitos da vida intrauterina na vida pós-natal. No trabalho de Burggen (2014) é possível perceber através de uma meta-análise das publicações relacionadas a epigenética um crescimento

considerável do número de trabalhos sobre esse assunto. Esse crescimento não se restringe apenas a medicina humana, mas também na sua aplicabilidade em animais de produção. O crescimento da quantidade de estudos nessa área representa uma evolução no conhecimento sobre os mecanismos epigenéticos e suas consequências no desenvolvimento de um indivíduo. Essa evolução permitiu, por exemplo, o conhecimento sobre dois momentos críticos e sensíveis as perturbações relacionados aos mecanismos epigenéticos: formação das células germinativas primordiais e desenvolvimento embrionário pré-implantação (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

Nesses dois momentos ocorre a reprogramação epigenética nas células, sejam elas gametas ou células embrionárias. Coincidentemente, nesses dois períodos de maior sensibilidade dos mecanismos epigenéticos a perturbações, ocorre a maior parte das manipulações nas técnicas de reprodução assistida (Urrego *et al.*, 2014). Dentre essas técnicas, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE) ou a fertilização *in vitro* (FIV), como é conhecida popularmente essa biotécnica. Essa biotécnica é composta basicamente de três etapas laboratoriais (maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro*), além de etapas envolvendo os gametas como a coleta e a criopreservação (Urrego *et al.*, 2014). Mesmo com o aumento da utilização dessa biotécnica, tanto na produção animal quanto na medicina humana, as condições laboratoriais de maneira geral estão muito distante das condições *in vivo* (Lonergan *et al.*, 2006). Essas diferenças que ainda são observadas na produção *in vitro* provocam estímulos nas células e conseqüentemente geram uma resposta diferente do que ocorreria naturalmente, levando assim, a uma alteração dos mecanismos epigenéticos (Urrego *et al.*, 2014). Essas alterações epigenéticas podem causar o surgimento de alguns fenótipos, na maioria das vezes indesejáveis, e que podem aparecer na vida pós-natal como consequência das condições sub-ótimas da vida embrionária (Eroglu e Layman, 2012; Hiura *et al.*, 2012).

### 3.6.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

O nascimento do primeiro bezerro produzido em laboratório por meio da fertilização *in vitro* (FIV) ocorreu em 1981. Anteriormente os embriões ficavam a menor quantidade de

dias possível no ambiente de laboratório, já nos dias atuais é possível manter os embriões por até 10 em laboratório (Van Wagendonk-de Leeuw, 2006).

Além do tempo de cultivo, diversos grupos de pesquisa passaram a explorar formas de aprimorar as condições e os meios de cultivo (Jones, 2001; Summers e Biggers, 2003; Van Wagendonk-de Leeuw, 2006). Entre os fatores mais estudados ao longo dos últimos anos estão: as condições de cultivo (com ou sem células em co-cultivo), o co-cultivo com células da tuba uterina ou com células do *cumulus*, a atmosfera gasosa com baixa tensão de oxigênio (5%) ou alta tensão (~20%), os meios de cultivo semi definidos com variação na composição e na concentração de alguns nutrientes, a redução na concentração do soro fetal bovino (SFB) e os meios de cultivo definidos, sendo estes utilizados principalmente na medicina humana (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000). O propósito de estudos nesta área é possibilitar que os embriões *in vitro* se desenvolvam o mais próximo possível das condições *in vivo* durante o período de pré-implantação.

O desenvolvimento embrionário neste período é caracterizado por eventos biológicos distintos e que ocorrem em sintonia, incluindo a primeira clivagem (divisão), a ativação do genoma embrionário, a compactação e a formação do blastocisto com a derivação em duas linhagens celulares: as células da massa celular interna (MCI) e as do trofoblasto (TE). O estágio de blastocisto é essencial no desenvolvimento embrionário inicial, e é dependente da formação de junções que selam os espaços intercelulares na camada de células externa do trofoblasto, levando a formação de uma cavidade repleta de fluido, denominada blastocel (Offenberg e Thomsen, 2005). Para que estas mudanças sejam bem sucedidas, existe uma expressão bem coordenada de genes (Lonergan *et al.*, 2006).

Diversos transcritos que parecem estar envolvidos de forma importante no desenvolvimento embrionário da fase de pré-implantação, são afetados pelo tipo de meio de cultivo e pelo tipo de suplemento proteico utilizado. Já foi demonstrado que embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados com protocolos diferentes, mas cultivados de forma idêntica, não demonstraram diferenças significativas em relação à expressão dos genes avaliados (Knijn *et al.*, 2002). Desta forma, o ambiente de cultivo (pós-fecundação) pode estar relacionado com a alteração do padrão de expressão gênica no embrião, que por sua vez, pode ter implicações na menor potencial de implantação e desenvolvimento em relação aos embriões produzidos *in vivo*, o que frequentemente tem sido associado à

ocorrência de anormalidades fetais e problemas perinatais (Numabe *et al.*, 2000; Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2006).

Na medicina humana, muitas causas de infertilidade foram solucionadas após o início da aplicação da fertilização *in vitro* em 1978. Casais que não conseguiam ter filhos naturalmente, passaram a ter à disposição as técnicas de reprodução assistida (TRA's) (Waal *et al.*, 2015). No entanto, as gestações obtidas a partir dessas técnicas são associadas com alguns riscos à saúde materna e fetal, a exemplo do aumento de natimortos, ocorrência de nascimentos prematuros, nascimento de bebês com baixo peso, placentação anormal e outras complicações gestacionais. Além disso, já foi relatado também aumento do risco de anomalias congênitas e desordens de *imprinting* raros, como as síndromes de Beckwith-Wiedemann, Russell-Silver e Angelman. Porém, além da dificuldade em realizar estudos com seres humanos existe a dificuldade em interpretar os efeitos das TRA's em função das condições dos pacientes, causas da infertilidade, diferenças da idade materna, índice de massa corporal e exposição ambiental (Waal *et al.*, 2015). De maneira geral, casais que fazem uso dessas biotecnologias, são casais que apresentam algum tipo de problema de fertilidade.

Em relação aos animais de produção, o uso dessas biotecnias vem ganhando cada vez mais espaço, tanto em bovinos de leite quanto de corte, atingindo não apenas os animais da categoria elite, mas também os de rebanho comercial (PortalDBO, 2015). A contribuição dessas ferramentas para o progresso genético dos animais e consequente aumento da produção, é inegável. No entanto, a baixa capacidade de desenvolvimento dos embriões *in vitro* quando comparados aos produzidos *in vivo* pode ser devido à manipulação que os gametas e embriões sofrem assim como as condições sub-ótimas de cultivo.

Embriões produzidos *in vitro* apresentam diversas diferenças em relação aos produzidos *in vivo*, tais como menor quantidade de células, maior acúmulo de lipídeos e menor criotolerância (Lonergan *et al.*, 2006). Estas diferenças provavelmente são influenciadas por vários fatores, como raça, qualidade do oócito, ambiente intrafolicular, interação touro/vaca e principalmente ambiente de cultivo embrionário. Os embriões produzidos *in vitro* geralmente possuem uma coloração mais escura, menor número de células, menor compactação, formação preCCOe da blastocle e alterações na relação MCI: células do trofoblasto, quando comparados àqueles que se desenvolvem *in vivo*. Observa-se também maior frequência de apoptose, menor tolerância à criopreservação e alterações na

expressão gênica e metabolismo celular (Knijn et al., 2002; Camargo et al., 2006; Lonergan et al., 2006).

Ainda, embriões produzidos *in vitro* geram animais com peso aumentado (Farin e Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1996; Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 1998), gestação mais demorada (Sinclair *et al.*, 1995; Kruip e den Daas, 1997), maior incidência de abortos (Hasler *et al.*, 1995), maior mortalidade perinatal (Behboodi *et al.*, 1994; Kruip e den Daas, 1997) e anomalias congênitas (Schimidt *et al.*, 1996). Inicialmente vários estudos relatavam esses e outros problemas em animais obtidos a partir da fertilização *in vitro* e os denominavam como a Síndrome do bezerro grande (Bertolini *et al.*, 2002; Ei Hajj e Haaf, 2013).

Os efeitos negativos das biotécnicas podem, em parte, serem explicados por alteração do perfil epigenético dos gametas e/ou dos embriões (Urrego *et al.*, 2014). A epigenética é o estudo de alterações herdáveis na expressão gênica que ocorre sem alteração na sequência de DNA (Wolffe e Guschin, 2000). Em mamíferos podem ocorrer basicamente de quatro formas diferentes: 1) Metilação do DNA; 2) Modificações pós-traducionais nas histonas; 3) Remodelamento da cromatina; 4) RNA's não-codificantes. Todos esses mecanismos regulam a expressão gênica que irá determinar o fenótipo do indivíduo (Urrego *et al.*, 2014).

O termo epigenética cunhado por Conrad Waddington em 1942 foi utilizado para descrever que a forma de vida de um organismo possibilita que seus genes se expressem de forma diferente, ou seja, o ambiente influencia a expressão gênica (Ferreira e Franco, 2012). Embora durante toda a vida de um indivíduo possa ocorrer alterações epigenéticas, sendo essas até mesmo herdáveis para as próximas gerações, existem dois momentos cruciais em que há essa reprogramação (Reik, 2007; Whitelaw e Whitelaw, 2008). O primeiro ocorre nas células germinativas primordiais (CGP) durante a gametogênese, e o segundo após a fertilização, na embriogênese inicial (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). Essa reprogramação coincide exatamente com o momento em que há a manipulação característica de todas as biotécnicas da reprodução, incluindo a PIVE.

Em mamíferos, de uma maneira geral, a maioria dos genes sofre ativação e desativação controladas por diversos eventos genéticos e epigenéticos durante o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos (Pan *et al.*, 2012). Em estudos utilizando camundongos como modelo, já foi demonstrado que a superovulação pode estar associada

com a redução da qualidade do oócito, com a redução do desenvolvimento embrionário e fetal (Van der Auwera e D’Hooghe, 2001; Ertzeid e Storeng, 2001), com distúrbios da reprogramação do genoma pós zigótica (Shi e Haaf, 2002; Waal *et al.*, 2012), com alteração da metilação do DNA e com o padrão de expressão em oócitos, embriões, fetos e placentas (Fauque *et al.*, 2007; Market-Velker *et al.*, 2009). Em humanos efeitos similares dos protocolos de superovulação já foram encontrados (Ludwig *et al.*, 2005; Khoueiry *et al.*, 2008). E, estudos mais recentes correlacionam frequência de algumas síndromes em crianças nascidas a partir de técnicas de reprodução assistida, possivelmente ocasionada por defeitos de metilação do DNA, especificamente a hipometilação anormal dos alelos maternos (Ludwig *et al.*, 2005; Haaf, 2006; Sutcliffe *et al.*, 2006; Owen e Segars, 2009).

O primeiro relato dos efeitos epigenéticos induzidos na vida embrionária/fetal e seus impactos na vida adulta, surgiu com um estudo retrospectivo realizado em mulheres holandesas gestantes nos anos de 1944- 1945, época da segunda guerra mundial (Rosekrans e First, 1991; Ravelli *et al.*, 1998). Foi observado que as crianças nascidas destas mulheres com privação alimentar durante este período, tinham um risco maior de desenvolverem problemas cardiovasculares e apresentaram tolerância reduzida a glicose 50 anos depois. Com essas evidências, outros estudos epidemiológicos indicaram que a exposição de mulheres gestantes a ambientes sub-ótimos pode ter consequências para as crianças em todas as fases de sua vida (Van Wagtedonk-de Leeuw *et al.*, 2000). Assim, criou-se a hipótese de que isso poderia ser aplicado na PIVE, uma vez que as condições laboratoriais ainda são sub-ótimas comparadas as condições *in vivo*. Logo, a presença de meios de cultivo não balanceados ou não determinados quanto a sua constituição, assim como, possíveis efeitos de alguns nutrientes ou da ausência de outros, poderia desencadear efeitos nos embriões produzidos *in vitro* que seriam observados em sua vida pós-natal (Van Wagtedonk-de Leeuw *et al.*, 2000).

A natureza regulatória do desenvolvimento embrionário inicial indica que os embriões podem ser sensíveis ao ambiente e adaptar-se a ele. Entretanto, a característica dinâmica e a ampla natureza da atividade de remodelamento epigenético, pode tornar esse estágio do desenvolvimento propenso às influências ambientais que alteram o status epigenético do embrião com consequências futuras (Gluckman e Hanson, 2004). Por exemplo, perturbações ambientais ao embrião, tais como longos períodos de cultivo *in vitro* sob condições sub-ótimas, não apenas confere efeitos negativos ao embrião, expressão gênica e homeostase

metabólica (Velker *et al.*, 2012 ), mas podem também prejudicar o seu desenvolvimento e fisiologia pós-natal, como foi observado em camundongos (Khosla *et al.*, 2001; Watkins e Fleming, 2009), ovinos (Sinclair *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001) e bovinos (Young *et al.*, 2001). Condições de cultivo em embriões humanos derivados da fertilização *in vitro* podem afetar o peso pós-natal nos primeiros dois anos de vida (Kleijkers *et al.*, 2014). Em adição, perturbações *in vitro* têm sido associadas também a mudanças no comportamento da prole (Mansouri-Attia *et al.*, 2009).

Sendo assim, os procedimentos exigidos das biotécnicas da reprodução, de uma maneira geral, coincidem cronologicamente com os estádios de desenvolvimento nos quais ocorre a reprogramação epigenética do genoma. Nesse momento a maquinaria molecular é mais sensível à influência externa e passível da ocorrência de erros (Laprise, 2009). Como resultado, embriões aparentemente normais são produzidos, entretanto, quando esses genes são necessários para a formação da placenta ou desenvolvimento fetal, algumas alterações fenotípicas podem ocorrer (Mansouri-Atti *et al.*, 2009).

### 3.6.2 Alterações fenotípicas indesejáveis relatadas

Indivíduos nascidos a partir da fertilização *in vitro*, sendo animais ou humanos, podem ter fenótipos alterados na vida pós-natal (Sakka *et al.*, 2010; Calle *et al.*, 2012; Valenzuela-Alcaraz *et al.*, 2013; Donjacour *et al.*, 2014). Esses fenótipos são, de maneira geral, indesejáveis, tanto na produção animal quanto na medicina humana, e podem ser transmitidos através das gerações (Calle *et al.*, 2012; Rexhaj *et al.*, 2013). Alguns já são reconhecidamente associados às TRA's, outros ainda não apresentam evidências quanto a essa relação.

#### 3.6.2.1 Alterações ligadas ao tamanho corporal e peso

Animais obtidos a partir da PIVE, normalmente, apresentam tamanho e peso acima da média (Young *et al.*, 1998; Rérat *et al.*, 2005). Diversos protocolos são utilizados na PIVE, assim como diversos meios de cultivos que podem variar na sua composição e também na concentração de seus compostos. As condições de cultivo *in vitro* são consideradas estáticas, visto que os oócitos e embriões ficam durante todas as etapas do cultivo numa mesma gota de

meio de cultura sobre uma placa de Petri de material plástico, sem que haja variação na concentração ou na constituição dos meios utilizados. Essas condições diferem bastante da encontrada no ambiente materno, que se mostra mais dinâmico.

Além disso, ainda é comum a adição de fonte proteica por meio do soro fetal bovino (SFB) aos meios de cultivo. Este soro possui papel crucial no desenvolvimento oocitário e embrionário, mas é um dos principais fatores causadores da formação de animais com tamanho e peso acima da média. Além da parte proteica, o SFB é constituído por hormônios e uma enorme diversidade de substâncias, que variam em função dos lotes de fabricação, sendo designados como meios indefinidos (Thompson, 1996). Outros fatores também podem ser responsáveis pelo crescimento exacerbado dos embriões, entre eles estão: os fatores de crescimento embriotróficos que podem compor o SFB e são produzidos pelas células no sistema de co-cultivo, a alta tensão de oxigênio que é utilizada em alguns protocolos, o sistema de cultivo estático e por fim, as altas concentrações de amônia que é uma consequência do metabolismo proteico celular (Behboodi *et al.*, 1994).

### 3.6.2.2 Alterações placentárias

Em mamíferos, a placenta é responsável por carrear nutrientes, regular a troca de gases e remover resíduos produzidos pelo feto em desenvolvimento durante a gestação. Problemas de perda gestacional e diversas anormalidades no desenvolvimento da placenta em gestações de embriões produzidos *in vitro* já foram descritos (Farin e Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Farin *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2002). Além disso, problemas com a vascularização inadequada, principalmente em embriões produzidos por transferência nuclear também já foram relatados (Hill *et al.*, 2000).

Os fetos derivados de PIVE apresentam hipermetilação do DNA, o que pode estar associado com o crescimento exagerado da placenta (Hiendleder *et al.*, 2004). Essa metilação causa expressão aberrante de genes que são importantes para o funcionamento placentário, ocasionando a manifestação dos fenótipos indesejados, tanto em modelos animais quanto em humanos (Arnaud, 2010). Na medicina humana, além dos procedimentos laboratoriais para a produção dos embriões, é comum a administração de hormônios exógenos para hiperestimulação, aumentando-se assim o número de folículos em desenvolvimento e a

quantidade de oócitos para a fertilização (Mainigi *et al.*, 2013). No entanto, esse tipo de tratamento também causa alteração do ambiente hormonal com concentrações supra fisiológicas, tanto para os oócitos em desenvolvimento quanto para o embrião durante o período de pré-implantação (Kim *et al.*, 2010). Essa alteração e a possível exposição dos embriões a esse ambiente alterado provocam resultados adversos tanto para o crescimento fetal quanto para a placentação (Kim *et al.*, 2010; Mainigi *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos já levantaram evidências sugerindo que durante o período de desenvolvimento embrionário, mecanismos epigenéticos possam ser alterados pela manipulação laboratorial, pelas condições de cultivo e pela estimulação endócrina (Nakamura *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Durante os procedimentos laboratoriais para produção *in vitro* de embriões, há alterações tanto das células embrionárias quanto das células extraembrionárias, sendo estas últimas as responsáveis por dar origem aos anexos embrionários (Denomme *et al.*, 2011).

### 3.6.2.3 Alterações umbilicais

Problemas de umbigo são relativamente comuns em animais obtidos através da fertilização *in vitro*. Porém, essa observação é resultante mais da percepção empírica dos profissionais envolvidos com o uso das biotécnicas do que através de estudos científicos.

Os relatos científicos mostram um alargamento do umbigo, principalmente em animais de transferência nuclear. Esta técnica é mais complexa que a produção *in vitro* de embriões, e conseqüentemente, mais susceptível a problemas epigenéticos. Como conseqüência do crescimento e desenvolvimento anormal da placenta e do próprio feto, observa-se que o cordão umbilical conjuntamente as veias e artérias que o compõe, também se desenvolvem de forma alterada. Esse crescimento, na maioria das vezes é exagerado e tem possivelmente a função de transportar nutrientes, regular trocas de gases e remover resíduos do feto em desenvolvimento durante a gestação. Conseqüência das condições sub-ótimas nutricionais observadas no cultivo do embrião ainda em fase pré-implantação. Ao analisar dados comerciais, foi observado que 37% dos animais que foram clonados apresentaram problemas de umbigo (Panarace *et al.*, 2007). O maior problema acarretado com esse tipo de

fenótipo são os problemas secundários que podem comprometer a vida do animal como, por exemplo, as infecções.

#### *3.6.2.4 Problemas cardiovasculares*

Na medicina humana estudos epidemiológicos mostraram associação de doenças cardiovasculares com as técnicas de reprodução assistida (TRA's). Em crianças oriundas das TRA's que são aparentemente saudáveis, já foi observado a presença de disfunção endotelial generalizada e alterações morfológicas da vascularização na circulação sistêmica (Scherrer *et al.*, 2015). Essa situação pode acarretar problemas posteriores como, por exemplo, arterioesclerose (Chakarida *et al.*, 2010; Scherrer *et al.*, 2015). Além disso, hipertensão arterial, hipertensão pulmonar, disfunções cardíacas e resistência à insulina também podem ser associadas como efeitos das TRA's (Ceelen *et al.*, 2008; Crispi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014; Rimoldi *et al.*, 2014). Porém, as biotécnicas em si, não são as principais causadoras dessas patologias, mas são responsáveis por aumentar a prevalência e o risco cardiovascular na vida adulta, além de aumentar mortalidade prematura (Scherrer *et al.*, 2015).

#### *3.6.2.5 Impacto na produção animal*

Já na reprodução de animais domésticos, um estudo mais recente demonstrou efeitos da produção *in vitro* de embriões na produção de vacas leiteiras. Além de outros fenótipos já descritos, foi demonstrado nesse trabalho menor produção de leite, gordura e proteínas dos animais obtidos a partir da PIVE utilizando sêmen sexado (Siqueira *et al.*, 2017 [in press]). Na bovinocultura de leite, a utilização do sêmen sexado é uma grande vantagem pois permite aumentar o número de fêmeas nascidas. Porém, mesmo com algumas vantagens, alguns efeitos indesejáveis podem minimizar as vantagens que o uso associado da FIV com sêmen sexado traz (Johnson, 2000; Racedo *et al.*, 2009).

Estudos buscando entender a relação e os resultados reais do uso da PIVE com características relacionadas a produção dos animais são essenciais e tem gerado grande interesse científico. No entanto, ainda são poucos os trabalhos avaliando a associação das biotécnicas com as possíveis alterações em fenótipos economicamente importantes (Siqueira *et al.*, 2017).

### 3.6.2.6 Síndromes em Humanos

Na medicina humana o principal uso da fertilização *in vitro* é o tratamento para casais que apresentam algum tipo de sub-fertilidade ou infertilidade. Existem estudos associando o uso dessa biotécnica com algumas desordens infantis. No entanto, em função da raridade de algumas síndromes, e dos possíveis efeitos que possam causar confusão, uma vez que os embriões são sensíveis a qualquer fonte de estresse, estudos nesta área são mais complexos, o que não elimina algumas evidências que demonstram que os procedimentos de fertilização *in vitro* afeta o epigenoma humano (Puumala *et al.*, 2012).

As síndromes Beckwith-Wiedemann e de Silver-Russell estão associadas com a hipermetilação da histona H19. A primeira causa um supercrescimento fetal e o diagnóstico é baseado nas características físicas do paciente (Vermeiden *et al.*, 2013). Já a síndrome de Silver-Russell é caracterizada por uma restrição de crescimento intrauterino e pós-natal, com desenvolvimento de macrocefalia associada a um rosto pequeno e triangular (Eggermann *et al.*, 2015). O diagnóstico também é clínico e com dois diferentes mecanismos genéticos agindo nos genes sujeitos a *imprinting* no cromossomo 11.

As síndromes de Angelman e de Prader-Willi estão mais associadas aos problemas de fertilidade que levam os casais a utilizarem a fertilização *in vitro* do que a técnica propriamente dita (Vermeiden *et al.*, 2013). A síndrome de Angelman é uma desordem neurogenética caracterizada por um retardo mental severo, com desenvolvimento motor deficiente, pouco equilíbrio e espasmos musculares. Já a síndrome de Prader-Willi é complexa e afeta o desenvolvimento neurológico. É causada por perdas de metilação de genes que são expressos nos cromossomos paternos (Kallén *et al.*, 2005; Sutcliffe *et al.*, 2006a; Doornbos *et al.*, 2007).

A Retinoblastoma, embora já tenha sido associada a PIVE, se sabe que não tem relação com essa biotecnica (Doornbos *et al.*, 2007; Hiura *et al.*, 2012). Retinoblastoma é um tipo de câncer que afeta a retina e pode ser causado por mutações no gene RB1 ou por uma hipermetilação desse gene ou mesmo ser herdável. De maneira geral essas síndromes são raras e os estudos de associação são feitos através de estudos epidemiológicos e estudos de caso. No entanto, seria interessante avaliar melhor o perfil de animais adultos produzidos por

fertilização *in vitro* para verificar se alguma das observações feitas em humanos também está presente em bovinos (Sirard, 2017).

### 3.6.3 Perspectivas do uso da PIVE no conhecimento da epigenética

Embora, muito já se tenha evoluído em relação aos meios de cultura e as técnicas utilizadas na produção *in vitro* de embriões, as condições laboratoriais ainda estão distantes de oferecer um ambiente similar ao que encontramos *in vivo*. Em consequência disso, ocorrem na fase embrionária inicial diversas alterações no epigenoma que podem ou não acarretar no aparecimento de fenótipos no indivíduo adulto. De maneira geral, esses fenótipos são indesejados e trazem problemas e prejuízos, tanto na produção animal quanto na medicina humana, em função das condições laboratoriais aquém das condições naturais. Porém, sabendo dessa sensibilidade embrionária as mudanças epigenéticas por meio da técnica de fertilização *in vitro*, abrem-se novas perspectivas de estudos para o conhecimento das possíveis alterações neste contexto, que sejam manipuladas para melhorar características, tanto ao que se refere a produção animal, como em benefício da saúde humana.

## Capítulo I

### ASPECTOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) COMERCIAL COM FOCO NA GERAÇÃO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO EM RAÇAS LEITEIRAS

#### RESUMO

O gado de leite tem uma contribuição expressiva para o total de embriões produzidos *in vitro* no Brasil. Dentre as principais raças leiteiras, destaca-se a raça Gir (*Bos indicus*) e a raça Holandesa (*Bos taurus*). Além da qualidade de ambas as raças, são importantes na produção de animais mestiços que apresentam boa adaptação e produção nas condições brasileiras. Contudo, ainda existe diversas fontes de variação nos resultados da PIVE, dentre as quais estão as doadoras e as raças. Diante disso, o objetivo foi compreender o papel da doadora de oócitos nas variações de resultados da PIVE em rotinas comerciais. Para isso, foi utilizado banco de dados com resultados de um laboratório de PIVE comercial. Todas as variáveis foram testadas quanto a normalidade. Dada a não normalidade utilizou-se o modelo estatístico SAS GLIMMIX (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão e foi considerado  $P < 0,05$ . Foi observado média similar de oócitos recuperados ( $13,8 \pm 0,5$  e  $13,3 \pm 0,6$  para as raças Gir e Holandesa, respectivamente), porém a taxa de oócitos viáveis foi maior na raça Gir (57,3% e 50,9% para as raças Gir e Holandesa, respectivamente). A maior parte dos animais, de ambas as raças, produziram quantidade de oócitos abaixo da média observada, entretanto os animais que produzem acima da média são os responsáveis pela maior parte dos oócitos coletado nas aspirações e também dos embriões produzidos. Existe uma ampla variação de resultados em função do touro utilizado, porém as taxas de blastocistos são maiores quando o oócito é obtido de uma matriz Gir, independente da raça do touro (Holandesa X Holandesa: 36,4% ; Gir X Gir: 59,2%; Holandesa X Gir: 40,4% ; Gir X Holandesa: 50,0%,  $p < 0,05$  ). A motilidade foi o único parâmetro espermático analisados que apresentou correlação com a produção de blastocistos ( $R = 0,47$  E  $P = 0,0002$ ). Em conclusão, a contribuição da doadora de oócitos nos resultados da PIVE é mais significativa do que o sêmen utilizado, sendo os oócitos obtidos de animais Gir mais competentes do que os obtidos de animais Holandesas. Adicionalmente, existe uma variação grande de produção de oócitos por doadora e que não reflete, necessariamente, na produção de blastocistos.

Palavras-Chave: PIVE.Gir. Holandes.

## ABSTRACT

*Dairy cattle have a significant contribution of the total of in vitro produced embryos in Brazil. Among the main dairy breeds, the Gyr breed (*Bos indicus*) and the Holstein breed (*Bos taurus*) highlight. Besides the quality of both breeds, they are important in the production of crossbred animals that have good adaptation and production under Brazilian conditions. However, there are still several sources of variation in IVEP results, including donors and breeds. Therefore, the objective was to understand the role of the oocyte donor in IVEP results variations in commercial routines. For this, a database with results from a commercial IVEP laboratory was used. All variables were tested for normality. Given the non-normality, the SAS GLIMMIX statistical model (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used. Results are presented as mean  $\pm$  standard error and was considered  $P < 0.05$ . A similar average of recovered oocytes was observed ( $13.8 \pm 0.5$  and  $13.3 \pm 0.6$  for Gyr and Holstein breed, respectively), but the viable oocyte rate was higher in Gyr (57.3% and 50.9% for Gyr and Holstein breeds, respectively). Most animals of both breeds produced oocytes below the average observed, but animals that produce above average are responsible for most of the oocytes collected in aspirations and also produced embryos. There is a wide range of results depending on the bull used, but blastocyst rates are higher when the oocyte is obtained from a Gyr donor, independent of the bull breed (Holstein X Holstein: 36.4%; Gyr X Gyr: 59, 2%; Holstein X Gyr: 40.4%; Gyr X Holstein: 50.0%,  $P < 0.05$ ). Motility was the only sperm parameter analyzed that correlated with blastocyst production ( $R = 0.47$  and  $P = 0.0002$ ). In conclusion, the contribution of oocyte donor to IVEP results is more significant than semen used, being oocytes obtained from Gyr animals more competent than those obtained from Holstein animals. In addition, there is a large variation in oocyte production per donor that does not necessarily reflect blastocyst production.*

*Keywords: IVEP. Gyr. Holstein.*

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o avanço das biotécnicas ligadas à reprodução possibilitou o melhor aproveitamento dos recursos genéticos disponíveis na bovinocultura, permitindo o melhoramento dos rebanhos e, no caso dos rebanhos leiteiros, aumento da produção média dos animais (Kruip, Bevers e B.Kemp, 2000; Sartori *et al.*, 2016). Dentre as biotécnicas disponíveis, destaca-se a PIVE, que após a disponibilidade do sêmen sexado comercialmente, permitiu um aumento do uso dessa técnica nas raças leiteiras. Em 2015, as raças leiteiras *Bos taurus* e os mestiços com taurinos se tornaram o mercado mais importante para a indústria de embriões, sendo responsáveis por 51,8% do total de embriões produzidos no Brasil (Viana *et al.*, 2017).

Dentre as raças zebuínas, a Gir se destaca como uma das principais raças leiteiras nos trópicos, sendo amplamente utilizada na América do Sul. No Brasil o melhoramento genético contribuiu para o aumento da produtividade desta raça. No entanto, ainda se observa um predomínio do gado Holandês em grandes fazendas de leite do Brasil (EMBRAPA Gado de leite, 2010). A produção de animais mestiços utilizando o cruzamento Gir x Holandês é uma estratégia adotada que permite aproveitar o vigor híbrido, aliando a resistência do gado zebuino com a alta produção leiteira do gado taurino (Facó *et al.*, 2008).

Diversos fatores podem influenciar os resultados da PIVE, incluindo variações individuais das doadoras, o ambiente folicular no qual os oócitos se desenvolvem, estacionalidade reprodutiva, fatores ligados ao sêmen, raça da doadora, qualidade do oócito e o ambiente de cultivo dos embriões (Camargo *et al.*, 2007; Lonergan *et al.*, 2006). Sabe-se, por exemplo, que os oócitos provenientes de fêmeas da raça Holandesa apresentam menor competência nos processos de PIVE quando comparados àqueles provenientes de animais da raça Gir (Camargo *et al.*, 2006).

Em rebanhos leiteiros, a seleção dos animais geralmente é baseada na produção de leite. Esse tipo de seleção muitas vezes impacta na fertilidade dos animais selecionados para alta produção que apresentam sistema metabólico peculiar. O perfil metabólico desses animais apresentam baixas concentrações circulantes de progesterona ( $P_4$ ) e estradiol ( $E_2$ ) e aumento das concentrações de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e Beta-hidroxibutirato (BHBA) (Leroy *et al.*, 2005; Wiltbank *et al.*, 2006).

Essas características metabólicas refletem diretamente no microambiente folicular, tornando-o sub-ótimo e comprometendo a qualidade do oócito e prejudicando a fertilidade da vaca (Leroy, Soom, Van, *et al.*, 2008; Leroy *et al.*, 2008; Sartori *et al.*, 2004; Sartori, Rosa e Wiltbank, 2002; Wiltbank *et al.*, 2006). Nesses casos, a qualidade dos oócitos pode ser considerada um importante fator que contribui para essa baixa fertilidade (Walsh, Williams e Evans, 2011).

O estado fisiológico da fêmea influencia na qualidade de seus oócitos. Sabe-se que animais adultos não lactantes apresentam maior produção de blastocistos na PIVE quando comparados com fêmeas adultas lactantes e novilhas (púberes e pré-púberes). Além disso, as fêmeas em lactação apresentaram uma menor quantidade de oócitos recuperados na aspiração folicular (Guerreiro *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014). Esses resultados indicam, que além de uma menor quantidade de oócitos, os mesmos apresentam uma menor competência de desenvolvimento nos animais durante a lactação. Porém, nessa fase outros fatores como a nutrição e a interferência ambiental, principalmente pelo estresse calórico, podem agir na qualidade oocitária (Baruselli, *et al.*, 2016a). Outro estudo com fêmeas lactantes demonstrou que animais em fase final de lactação, apresentaram menor taxa de produção de blastocistos quando comparados a animais em fase inicial. Indicando que esses, no final da lactação são propensos à resistência a insulina, o que influencia na qualidade dos oócitos e pode contribuir para uma menor eficiência na PIVE (Baruselli, *et al.*, 2016b). Por outro lado, em animais fora do período de lactação, quando se realiza a aspiração folicular em doadoras gestantes, o resultado da taxa de blastocistos é maior comparada a animais púberes e pré-púberes (Bayeux *et al.*, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos desse estudo foram:

- Estudar o comportamento de produção de oócitos de doadoras Gir e Holandesa;
- Estudar a relação da produção de oócitos com a produção de blastocistos *in vitro*;
- Compreender o efeito do touro nos resultados da PIVE;

- Estudar a relação dos parâmetros espermáticos com os resultados da PIVE.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL E ANIMAIS

Os dados utilizados foram do laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos, Ativa Embriões, localizado em Juiz de Fora, MG, Latitude 21° 45' 51" S; Longitude 43° 21' 01" W, Altitude 695m. Foram utilizados dados associados ao processo de produção *in vitro* de embriões de doadoras das raças Gir e Holandesa provenientes de rebanhos diferentes das regiões da zona da mata mineira, vertentes e sul do estado do Rio de Janeiro, e com histórico reprodutivo (idade, número de aspirações, taxa de produção de oócitos e embriões) conhecido.



Figura 1: Esquerda: Animal da raça gir. Direita: Animal da raça Holandesa  
Fonte: Arquivo pessoal e Embrapa gado de leite

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Os resultados apresentados foram obtidos a partir da análise dos resultados da produção *in vitro* de embriões obtidos entre março de 2011 a junho 2013. Os dados obtidos apresentavam uma grande quantidade de variáveis, e por essa razão, foi realizado uma seleção e somente algumas variáveis foram analisadas, conforme descrito na tabela 1. Foram selecionadas as variáveis que melhor explicam o potencial das doadoras de oócitos.

Tabela 1: Caracterização da base de dados utilizada

| Dados                            | N      |
|----------------------------------|--------|
| Doadoras Gir                     | 264    |
| Doadoras HPB                     | 228    |
| Número de aspirações em Gir      | 546    |
| Número de aspirações em HPB      | 270    |
| Total de touros utilizados       | 35     |
| Total de CCO recuperados         | 11.072 |
| Total de blastocistos produzidos | 2.988  |

### 3.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

#### 3.3.1 Coleta dos complexos *cumulus*-oócitos (CCO)

A aspiração folicular foi realizada com auxílio de um aparelho portátil de ultrassonografia equipado com transdutor setorial de 7,5 MHz adaptado para exame intravaginal e com guia para agulha de biópsia (Aquila, Esaote-Pie Medical, Maastricht, Holanda). Agulhas descartáveis (20 G) foram acopladas a um sistema de vácuo com pressão aproximada de 50 mmHg ou equivalente ao fluxo de 11 mL por minuto. O líquido folicular e complexos *cumulus*-oócitos foram aspirados para um tubo de 50 mL contendo 10 mL de Dulbecco's PBS (DPBS) (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Nutricell) e 100UI de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça), e aquecido a 36°C. Todos os CCO recuperados foram mantidos em criotubos devidamente identificados com meio tamponado, e transportados para o laboratório em intervalo de 3 a 12 horas a 37°C. Ao chegar no laboratório, os CCO foram classificados segundo Viana et al., 2004, por uma mesma pessoa, e somente os viáveis (Grau I, Grau II e Grau III) foram considerados.

#### 3.3.2 Maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócito (CCO)

A maturação *in vitro* dos CCO foi realizada em meio TCM 199 (Gibco) crescido de 10% de soro fetal bovino, FSH, LH e estrógeno, piruvato e antibiótico em gotas de 70µL, na estufa incubadora a 38,8 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de

umidade, por 24 horas. Os oócitos (de 1 a 30 oócitos por gota) de cada doadora foram colocados em gotas separadas.

### 3.3.3 Fecundação *in vitro* dos oócitos

Os CCO maturados foram fecundados utilizando sêmen de touros provados obtidos das centrais especializadas na comercialização de sêmen. Para preparação dos espermatozoides foi utilizado o método do gradiente de Percoll (GE Healthcare, Suécia), realizado com os gradientes de 45% e 90%. A fecundação foi realizada na gota de 60 $\mu$ L de meio FIV (Vitrogen) contendo heparina e com  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sob óleo mineral, por um período de aproximadamente de 18-22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação.

Em função da utilização de touros tanto da raça Gir quanto da raça Holandesa, para efeito de análise os dados foram segmentados em grupos conforme o cruzamento (doadora x touro).

Para a avaliação dos parâmetros espermáticos e os resultados de PIVE, motilidade e vigor foram avaliados após o preparo em Percoll.

### 3.3.4 Cultivo *in vitro* dos presumíveis zigotos

Para o cultivo dos presumíveis zigotos, foi utilizado CR4aa (Vitrogen) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e BSA. Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições da fecundação, no entanto em gotas de 50 $\mu$ L, sob óleo mineral, mantendo a quantidade de CCO colocados inicialmente na MIV. Após 72 horas do início do cultivo, foi realizado o primeiro *feeding*, que consiste na troca de 50% do meio e a taxa de clivagem avaliada. No sexto dia foi realizado novamente o *feeding*. No sexto e sétimo dia após a fecundação a taxa de blastocisto foi avaliada.

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estrutura da base de dados está apresentada na Tabela 1. Todas as variáveis foram inicialmente testadas quanto a normalidade utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk.

Dada a não normalidade dos dados, optou-se por utilizar o modelo estatístico SAS GLIMMIX (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), com ajuste para distribuição de dados tipo Gama. O modelo estatístico incluiu os efeitos principais de raça da doadora, cruzamento, touro, e tipo de sêmen, e os efeitos aleatórios de doadora, sessão de aspiração, e equipe de aspiração. Os resultados da aspiração folicular e da PIVE foram também ranqueados em quartis, nas raças Gir e Holandesa, e as respectivas médias comparadas pelo Teste de Tukey. Dados percentuais foram comparados utilizando-se o método do Qui-quadrado. Análises de associação foram realizadas utilizando-se o método das correlações de Pearson. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. O valor de P de 0,05 foi utilizado para determinar diferenças significativas.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados foram divididos em duas partes. A primeira parte destinou-se aos resultados obtidos da avaliação do efeito da raça e cruzamento no desempenho na OPU-PIVE, enquanto a segunda foi sobre a associação entre parâmetros seminais e PIVE.

##### **4.1 EFEITO DA RAÇA E CRUZAMENTO NO DESEMPENHO NA OPU – PIVE**

A Tabela 2 demonstra a quantidade de vezes que uma mesma doadora foi aspirada. É possível observar que a grande maioria dos animais foram aspiradas uma única vez ou apenas duas vezes em um intervalo de aproximadamente 2,5 anos, período que compreende os dados utilizados. Poucos animais, basicamente da raça Gir, foram aspiradas diversas vezes, sendo o máximo de vezes que um animal foi aspirado foi 14, nesse mesmo período. Considerando a população total de animais utilizada nesse estudo 79,5% dos animais Gir foram aspiradas uma ou duas vezes, enquanto na raça Holandesa isso fica ainda mais evidente, pois 98,7% dos animais foram aspirados uma ou duas vezes apenas.

A PIVE possibilita aumentar o número de descendentes de uma única fêmea podendo realizar sessões de aspirações com intervalos relativamente curtos, chegando até uma OPU por semana em algumas situações. Embora, tenha sido relatado que

intervalos curtos pode apresentar melhora na qualidade dos oócitos (Blondin e Sirard, 1995; Merton *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2004) com o aumento da frequência de aspirações pode-se também aumentar as lesões e reduzir a vida útil desses animais enquanto doadoras de oócitos, principalmente se a aspiração não for realizada de maneira criteriosa (Seneda, Blaschi e Lisboa, 2005). Entretanto, nosso resultado apontou para grande maioria dos animais sendo aspirados poucas vezes em um intervalo de 2,5 anos, indicando que provavelmente são animais que compõe rebanhos e não são considerados unicamente como doadoras de oócitos. Para a produção de animais de elite, nos quais muitas vezes são puro de origem (PO), normalmente, as fêmeas consideradas melhores são aspiradas diversas vezes de forma a multiplicar a genética daquele animal (Gimenes *et al.*, 2015). Por outro lado, para a produção de animais de produção, em sua maioria animais mestiços F1 (Gir X Holandes) não há necessidade de se preocupar com genealogia da fêmea ou características raciais, e sim com características de produção que serão importantes nos animais gerados.

Tabela 2: Número e percentual de doadoras submetidas a diferentes números de aspirações

| Número máximo de aspirações | Gir |       | HPB |       |
|-----------------------------|-----|-------|-----|-------|
|                             | N   | %     | N   | %     |
| 1                           | 174 | 65,9  | 190 | 83,3  |
| 2                           | 36  | 13,6  | 35  | 15,4  |
| 3                           | 14  | 5,3   | 2   | 0,9   |
| 4                           | 12  | 4,5   | 1   | 0,4   |
| 5                           | 6   | 2,3   | 0   | 0,0   |
| 6                           | 4   | 1,5   | 0   | 0,0   |
| 7                           | 6   | 2,3   | 0   | 0,0   |
| 8                           | 5   | 1,9   | 0   | 0,0   |
| 9                           | 4   | 1,5   | 0   | 0,0   |
| 10                          | 0   | 0,0   | 0   | 0,0   |
| 11                          | 1   | 0,4   | 0   | 0,0   |
| 12                          | 0   | 0,0   | 0   | 0,0   |
| 13                          | 1   | 0,4   | 0   | 0,0   |
| 14                          | 1   | 0,4   | 0   | 0,0   |
| Total                       | 264 | 100,0 | 228 | 100,0 |

Para os parâmetros relacionados a aspiração folicular, observamos que a quantidade total de oócitos, assim como a quantidade total de viáveis, mesmo considerando os de Grau I, II, III individualmente, não teve diferenças entre os animais da raça Gir e da raça Holandesa. Por outro lado, a taxa de viáveis, assim como os degenerados foi diferente entre as duas raças (Tabela 3).

Embora a quantidade de animais analisados no estudo na raça Gir tenha sido praticamente o dobro de animais da raça Holandesa, a taxa de recuperação total de oócitos foi a mesma. Na literatura já foi descrito produção maior de oócitos de animais zebuínos comparado a animais taurinos, incluindo a raça Gir e Holandesa (Grázia, 2014; Lopez *et al.*, 2015). Possivelmente os animais da raça Holandesa em que foi realizado a aspiração folicular desse estudo tiveram uma seleção e somente os animais com maior quantidade de oócitos foram escolhidos para a coleta de oócitos, como forma de tentar aumentar a produção de embriões desses animais. Já foi descrito que animais com maior produção de oócitos tende a produzir maior quantidade de embriões *in vitro* (Guerreiro *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2017). No entanto, maior produção de blastocistos não irá refletir em maiores taxas de gestação (Feres *et al.*, 2018). A maior quantidade de oócitos produzidos pelas doadoras Holandesas não refletiu na proporção de oócitos viáveis, aqueles considerados de melhor qualidade para a PIVE segundo avaliação morfológica. Possivelmente, indicando uma pior qualidade desses oócitos, pois mesmo a quantidade total recuperada sendo igual aos animais da raça Gir, já foi relatado diferenças de qualidade o que poderá refletir na produção de embriões, entre os diferentes grupamentos genéticos (Lopez *et al.*, 2015).

Tabela 3: Recuperação de CCO [Média ± EPM (variação) e valor de P]

| Parâmetro              | Gir                     | HPB                     | P             |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| N                      | 546                     | 270                     |               |
| Oócitos totais         | 13,8±0,5 (0 - 92)       | 13,3±0,6 (0 - 62)       | 0,4084        |
| Grau I                 | 0,3±0,0 (0 - 6)         | 0,2±0,0 (0 - 3)         | 1,0000        |
| Grau II                | 1,0±0,1 (0 - 25)        | 0,6±0,1 (0 - 7)         | 0,8237        |
| Grau III               | 6,5±0,3 (0 - 58)        | 6,0±0,3 (0 - 29)        | 0,9282        |
| Total viáveis          | 7,9±0,3 (0 - 58)        | 6,8±0,3 (0 - 29)        | 0,8280        |
| <b>Taxa de viáveis</b> | <b>57,3%</b>            | <b>50,9%</b>            | <b>0,0003</b> |
| <b>Degenerados</b>     | <b>5,9±0,3 (0 - 39)</b> | <b>6,5±0,4 (0 - 44)</b> | <b>0,0278</b> |

\*em negrito resultados com diferença significativa.

Embora a média de produção de oócitos tenha sido igual entre as duas raças, a variação encontrada na raça Gir é maior, há animais produzindo 92 oócitos, enquanto na raça Holandesa, o animal que mais produziu foi 62 oócitos (Tabela 3). Avaliando a distribuição de animais por quantidade de oócitos recuperados por aspiração folicular observamos que a média de oócitos total recuperados não coincide com a maior frequência encontrada em nenhuma das duas raças (Figura 2). Ou seja, a quantidade de oócitos mais observada recuperada de uma doadora, em ambas as raças, não é a média de oócitos produzidos pela população de animais da raça. A frequência de animais que produzem quantidade inferior à média observada, é maior do que a de animais que produzem quantidade igual a média. Isso indica que a média, como medida de avaliação de performance para quantidade de oócitos, não é uma medida muito informativa. No entanto, na literatura diversos trabalhos apresentam os resultados de produção de oócitos como média (Pontes *et al.*, 2010; Guerreiro *et al.*, 2014; Grázia *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016), sendo essa, ainda, uma medida consagrada.

A distribuição de animais, baseado na produção de oócitos, não segue o padrão normal de distribuição e por isso, a média das populações pode ser diferente em função da seleção de animais com mais ou menos quantidade de oócitos a ser aspirado. A quantidade de animais que estão acima ou abaixo da média se distribui de forma não igualitária, existindo uma concentração maior de animais que produzem menos oócitos do que a média, enquanto há uma grande dispersão de animais acima da média, podendo chegar a 92 oócitos, no caso da raça Gir, porém em menor frequência a medida que essa quantidade aumenta (Figura 2).

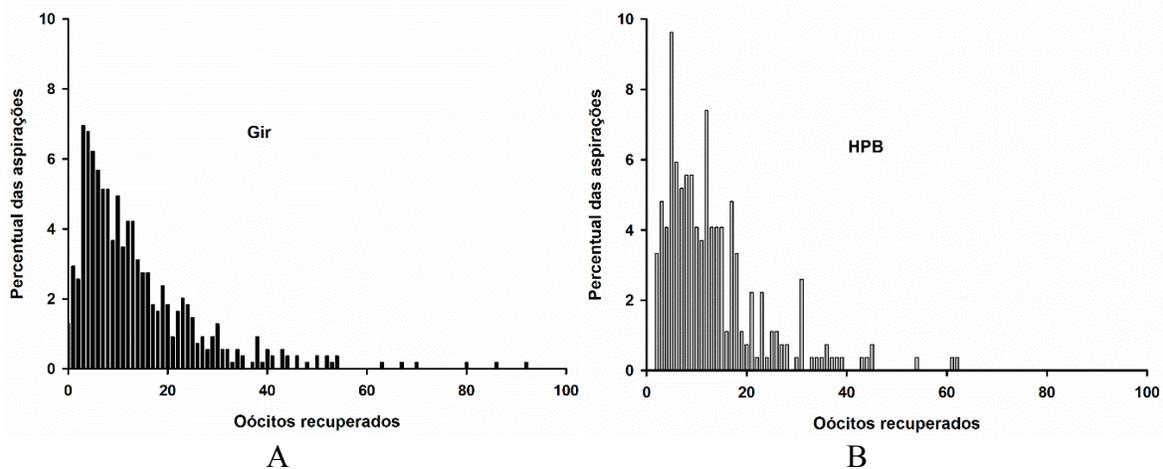


Figura 2: Distribuição de frequência das aspirações em função do número de oócitos recuperados nas raças Gir (A) e Holandesa (B)

A Figura 3 (A e B) demonstra que existe uma grande variação na produção de oócitos, nos animais Gir variando de 0 a 92 oócitos (Figura 3 A) e na raça Holandesa variando de 0 a 62 oócitos (Figura 3 B). Nos animais Gir, a curva de distribuição de oócitos totais recuperados se eleva de maneira mais rápida comparada aos animais da raça Holandesa. Em ambas as raças, existe um ponto de inflexão a partir de uma certa quantidade de oócitos, sendo esse ponto superior na raça Gir. Isso indica que a distribuição de oócitos apresenta uma linearidade, principalmente nos animais que apresentam uma produção menor, e à medida que se aumenta a quantidade de oócitos recuperados a curva se torna ascendente de forma mais acentuada. Sendo que nos animais Gir, embora a média tenha sido igual, existe uma quantidade maior de animais com produção de oócitos acima à média quando comparados a raça Holandesa. Considerando que para essa variável, oócitos, é possível variação de 0 até um número, em teoria, ilimitado. Já sendo relatado animais com produção de mais de 480 oócitos (comunicação pessoal).

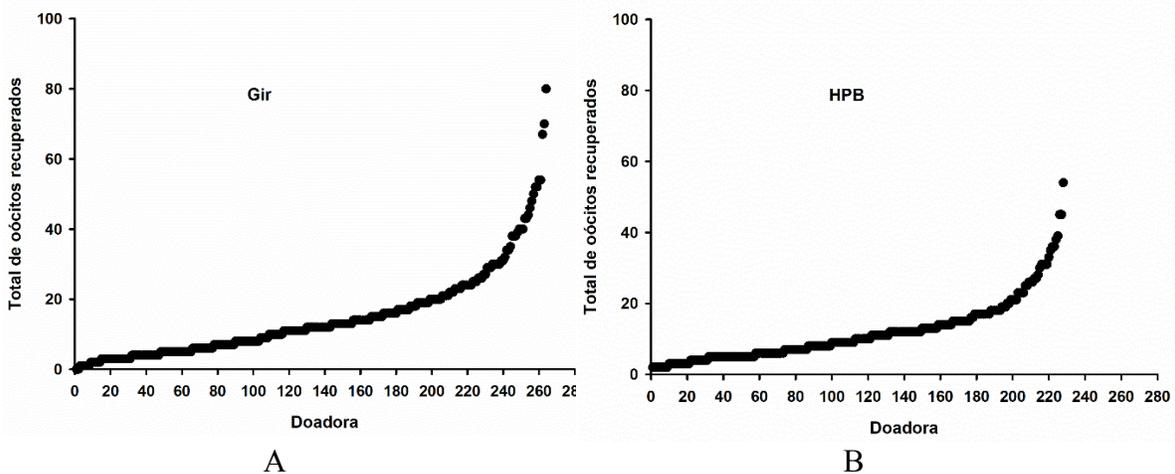


Figura 3: Distribuição (ordem crescente) das doadoras em função do número total de oócitos recuperados nas raças Gir (A) e Holandesa (B)

Baseado na produção total de oócitos (CCO totais) foi realizado a divisão das doadoras, de ambas as raças, em quartis. Após a divisão em quartis, foi realizado a

comparação entre as duas raças dentro do mesmo quartil e das duas raças de um quartil com outro. A média de produção de oócitos foi igual entre as duas raças, conforme demonstrado na Tabela 4. Porém, nos dois primeiros quartis, os quais constam os animais que menos produziram oócitos, os animais da raça Holandesa apresentam uma média superior aos animais Gir. Enquanto nos dois últimos quartis, nos quais constam os animais que mais produziram oócitos, não há diferença da média entre as duas raças. Já para os oócitos viáveis, somente no último quartil há diferença, no qual a raça Gir obteve maior quantidade. Com relação a clivagem, o número de clivados foi igual entre as duas raças nos dois primeiros quartis e diferente nos dois últimos quartis. Considerando a taxa de clivagem (eficiência relativa), houve diferença entre as duas raças nos últimos três quartis. A produção de blastocistos, em números absolutos, no sétimo dia e total houve diferença entre as raças somente nos dois últimos quartis. Em ambos os parâmetros os animais da raça Holandesa, do último quartil, que mais produziram, tiveram média igual aos animais da raça Gir do terceiro quartil. Já para a taxa de blastocistos, houve diferenças entre as duas raças nos últimos três quartis. Avaliando os animais de cada quartil, observa-se que os animais Gir dos dois últimos quartis foram os de melhor eficiência e apresentam média similar, enquanto para a raça Holandesa os animais que tiveram produção mais eficiente foram os do terceiro quartil. Os animais da raça Holandesa que mais produziram oócitos (IV quartil) tiveram média de produção de blastocisto igual aos animais da raça Gir que menos produziram oócitos (I quartil). Para os parâmetros, oócitos totais, oócitos viáveis e número de clivados houve diferenças entre os quartis para ambas as raças. Por outro lado, para taxa de clivagem, de maneira geral não houve diferenças entre os quartis. Somente entre o primeiro e último quartil houve diferença na Raça Gir (Tabela 4).

Embora exista uma relação positiva entre quantidade de oócitos produzidos e produção de blastocistos, demonstrado pela contagem de folículo antral e concentração de Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) (Guerreiro *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016), no presente estudo a maior quantidade de oócitos produzidos não representou maior eficiência na PIVE. Enquanto na raça Gir houve uma relação positiva entre produção total de oócitos com oócitos viáveis, clivados, taxa de clivagem, quantidade de blastocistos no sétimo dia, quantidade total de blastocistos e taxa de blastocisto. Na raça

Holandesa uma maior produção de oócitos não significou maior eficiência na PIVE, considerando como parâmetros taxa de clivagem e quantidades e taxa de blastocistos. Os resultados indicam uma baixa qualidade dos oócitos de animais Holandesas comparados aos animais Gir, sendo que maior quantidade de oócitos produzidos não implica em oócitos de boa qualidade para a PIVE. E, embora, a quantidade de oócitos viáveis seja proporcional a quantidade de oócitos total, deve-se levar em consideração que em rotinas comerciais a avaliação dos oócitos se faz por critérios morfológicos, o que nem sempre consegue definir aqueles com maior competência de desenvolvimento (Blondin e Sirard, 1995).

Tabela 4: Distribuição das doadoras por quartis com base na produção de CCO totais

| Quartil | Raça | CCO totais | Viáveis    | CCO Grau I | Clivados   | Clivagem (%) | BL dia 7  | BL Total   | Blastoc (%) |
|---------|------|------------|------------|------------|------------|--------------|-----------|------------|-------------|
| I       | Gir  | 3,3±0,1 a  | 1,9±0,1 a  | 0,1±0,0    | 1,5±0,1 a  | 74,4 ab      | 0,6±0, a  | 0,7±0,1a   | 34,3 a      |
|         | HPB  | 4,4±0,2 b  | 2,3±0,1 a  | 0,1±0,0    | 1,8±0,1 a  | 73,8 ab      | 0,8±0,1ab | 1,0±0,1 a  | 39,0 ab     |
| II      | Gir  | 7,9±0,1 c  | 4,2±0,2 b  | 0,1±0,0    | 3,5±0,1 b  | 81,7 c       | 1,7±0,1c  | 2,0±0,2 c  | 48,0 c      |
|         | HPB  | 8,8±0,2 d  | 4,6±0,2 b  | 0,1±0,0    | 3,4±0,2 b  | 72,1 ab      | 1,2±0,2bc | 1,6±0,2 bc | 34,7 a      |
| III     | Gir  | 13,9±0,2 e | 8,3±0,3 c  | 0,2±0,1    | 7,0±0,2 c  | 84,4 cd      | 3,8±0,2e  | 4,6±0,3 e  | 55,8 d      |
|         | HPB  | 14,1±0,2 e | 7,4±0,3 c  | 0,1±0,0    | 5,7±0,3 d  | 76,4 b       | 2,9±0,3d  | 3,4±0,3 d  | 45,3 bc     |
| IV      | Gir  | 30,8±1,2 f | 17,6±0,8 d | 1,0±0,1    | 15,3±0,7 e | 86,9 d       | 8,3±0,5f  | 9,7±0,5 f  | 55,1 d      |
|         | HPB  | 28,2±1,3 f | 14,0±0,7 e | 0,4±0,1    | 9,9±0,6 f  | 70,9 a       | 4,0±0,5e  | 5,0±0,5    | 35,9 a      |

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05)

Tabela 5: Distribuição por cruzamento

| Matriz | Touro | N   | CCO totais | Viáveis   | CCO Grau I | Clivados  | Cliv. (%) | BL dia 7   | BL Total   | Blastoc (%) |
|--------|-------|-----|------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|
| HPB    | HPB   | 137 | 13,6±1,0 a | 6,1±0,5 a | 0,2±0,0 a  | 5,0±0,4 a | 77,9 b    | 1,9±0,2 a  | 2,3±0,3 a  | 36,4 a      |
| Gir    | Gir   | 179 | 13,1±0,9 a | 7,8±0,6 a | 0,4±0,1 a  | 6,8±0,5 a | 85,9 c    | 4,1±0,4 b  | 4,7±0,4 b  | 59,2 c      |
| HPB    | Gir   | 133 | 13,0±0,8 a | 7,5±0,5 a | 0,2±0,0 a  | 5,2±0,4 a | 68,7 a    | 2,4±0,2 ab | 3,1±0,3 ab | 40,4 a      |
| Gir    | HPB   | 367 | 14,1±0,7 a | 7,9±0,4 a | 0,3±0,0 a  | 6,9±0,4 a | 84,3 c    | 3,4±0,2 b  | 4,1±0,2 b  | 50,0 b      |

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05)

Realizou-se também a distribuição por cruzamentos, nos quais se considerou a raça do touro utilizado na fertilização. Não houve diferenças de produção de oócitos totais, oócitos viáveis, oócitos de Grau I e de quantidade de estruturas clivadas entre os quatro cruzamentos. Porém, para os parâmetros taxa de clivagem, quantidade de blastocistos no sétimo dia e total e taxa de blastocistos houve diferenças entre os cruzamentos (Tabela 5). Quando os oócitos utilizados na PIVE foram obtidos de animais Gir, as taxas de clivagem e blastocistos, foram superiores aqueles cruzamentos que os oócitos foram obtidos de animais da raça Holandesa, independente da raça do touro que foi utilizado para fertilizá-los. A taxa de clivagem entre os cruzamentos utilizando matriz Gir foi igual, tanto acasalando com Gir quanto Holandes, enquanto a taxa de blastocisto para o cruzamento utilizando matriz Gir e touro Gir foi superior aqueles que o touro utilizado foi Holandês. Já para a quantidade de blastocistos o cruzamento que foi utilizado somente animais da raça Holandesa apresentou os menores resultados. Nesse caso, a utilização de um touro Gir permitiu um aumento da quantidade de blastocistos produzidos mesmo com os oócitos de doadoras Holandesas (Tabela 5).

Esses resultados evidenciam a importância dos oócitos na PIVE e corrobora com os resultados apresentados na Tabela 4. Além de reforçar a diferença de produção entre animais taurinos e zebuínos. O aumento da eficiência de produção de blastocistos está mais relacionada a qualidade dos oócitos recuperados do que ao touro utilizado, uma vez que touros da raça Holandesa tiveram resultados maiores quando utilizados em oócitos da raça Gir comparados aos oócitos da raça Holandesa, da mesma maneira que touros da raça Gir tiveram resultados inferiores quando acasalados com doadoras da raça Holandesas comparados com doadoras da raça Gir.

Embora diversos fatores podem afetar os resultados na PIVE (Camargo *et al.*, 2006), a qualidade do oócitos é primordial para alcançar resultados de produção de blastocistos satisfatórios (Lonergan *et al.*, 2006), e para isso fatores como estado fisiológico da doadora, nutrição, idade, raça e ambiente, dentro outros devem ser considerados e, dentro do possível, controlados em programas de PIVE. Como os resultados obtidos no presente estudo são originários de uma rotina comercial, todos esses fatores citados foram casualizados e considerado somente a raça da doadora. Sabendo que a qualidade do oócito é influenciado por diversos fatores, sendo alguns

deles de difícil controle, e que em uma rotina comercial se trabalha com animais em diversas situações, a quantidade de oócitos é uma ferramenta que se torna prática para seleção de doadoras para rotinas de OPU-PIVE.

Considerando a quantidade de oócitos produzidos por cada doadora, se avaliou a participação de cada uma, em porcentagem, no total acumulado de oócitos e de blastocistos produzidos. Ou seja, buscou compreender qual foi a produção de oócitos individual dos animais que contribuíram, mais ou menos, para o total de oócitos recuperados e blastocistos produzidos incluídos nesse estudo. Observando, primeiramente a Figura 4A, é possível identificar que os animais que produziram mais oócitos foram os que mais contribuíram para o total de oócitos, tanto na raça Gir quanto na raça Holandesa. Os animais que produziram 0 oócitos contribuíram com 0% do total de oócitos e assim por diante. Na raça Holandesa, a curva fica acima da curva dos animais Gir, pois atinge o total (100% dos oócitos recuperados) mais rápido do que nas doadoras Gir, uma vez que a produção máxima de oócito por uma doadora foi menor, conforme demonstrado anteriormente na Tabela 3 (92 oócitos produzidos por um animal na raça Gir e 62 produzidos por uma doadora da raça Holandesa). A Figura 4B, segue a mesma tendência, uma vez que os animais da raça Holandesa atingem o total de 100% de blastocistos produzidos antes do que os animais da raça Gir, em função da quantidade máxima de oócitos produzidos por um animal.

É possível observar que do total, tanto de oócitos quanto de blastocistos, a maior contribuição vem dos animais que produziram quantidade de oócitos superior à média (aproximadamente 13 oócitos em ambas as raças) observada no estudo. Embora a quantidade de animais que produzem muitos oócitos seja menor do que a quantidade de animais que produzem poucos oócitos, esses animais que produzem muitos oócitos tem um papel mais efetivo no total, conforme Figura 2. Isso reforça a ideia de que a média, enquanto medida de avaliação de performance na PIVE, não é uma medida muito informativa.

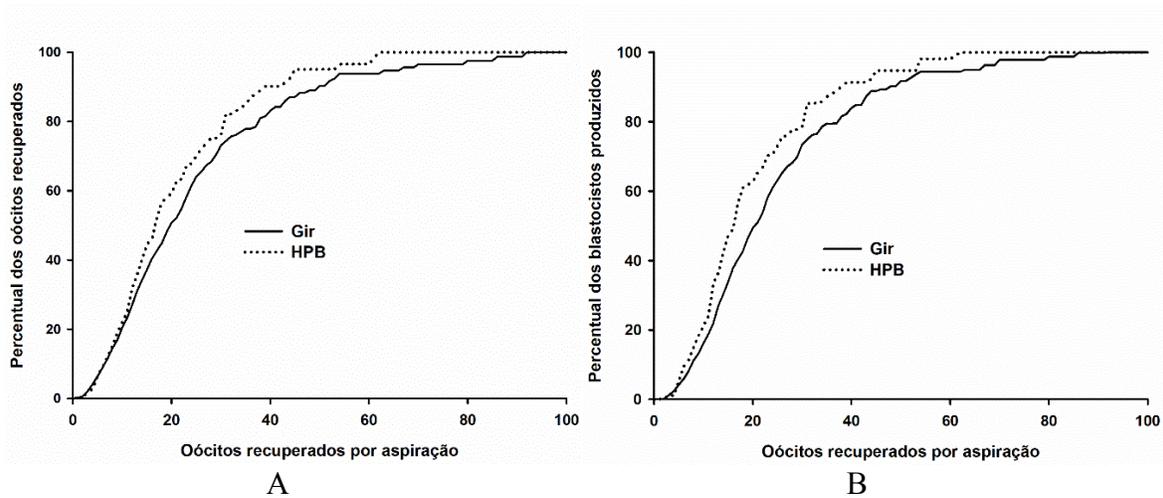


Figura 4: Percentual acumulado de óocitos recuperados (A) e embriões produzidos (B) em função do número de óocitos recuperados por aspiração

Utilizando a média de óocitos produzidos como parâmetro de referência, é possível observar que a maior quantidade de animais produz CCO abaixo da média, porém esses animais só contribuem com 34,1% na raça Gir e 40,0% na raça Holandesa do total de óocitos recuperados. Da mesma forma, do total de blastocistos, 30,2% foram produzidos por animais que estão abaixo da média na raça Gir e 42,2% na raça Holandesa. Em ambos os parâmetros analisados houve diferença entre as duas raças, nos quais para a raça Holandesa a contribuição dos animais que produziram CCO abaixo da média foi mais representativa para o total do que na raça Gir (Tabela 6). Apesar da menor quantidade de doadoras que produzem quantidade de óocitos acima da média, a contribuição desses animais para o total de óocitos e blastocistos é maior. Sendo 65,9% na raça Gir e 60% na raça Holandesa para CCO total e 69,8% e 57,8% para Gir e Holandesa respectivamente, para total de blastocistos. Isso reforça a ideia de assimetria na distribuição de animais por produção de óocitos e que a média em si é pouco informativa. O montante mais significativo, de óocitos e de blastocistos, vem dos animais, poucos, que apresentaram produção de CCO acima da média. Por outro lado, a maior quantidade dos animais analisados dentro de cada raça produz óocitos abaixo da média e possuem menor contribuição para o total. No entanto, em rotinas comerciais, a seleção de animais com base na quantidade de óocitos produzidos pode ser uma boa opção para aumentar a quantidade de blastocistos por doadora em números absolutos, embora não necessariamente irá refletir em melhora na eficiência.

Tabela 6: Total acumulado de CCO recuperados e blastocistos produzidos em aspirações que produziram até 14 oócitos, i.e, abaixo das respectivas médias nas raças Gir e Holandesa

| Raça      | Média CCO/OPU | CCO Total < Média (%) | BL Total < Média (%) |
|-----------|---------------|-----------------------|----------------------|
| Gir       | 13,8±0,5      | 34,1 a                | 30,2 a               |
| Holandesa | 13,3±0,6      | 40,0 b                | 42,2 b               |

a,b Percentuais seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ( $X_2$ ,  $P < 0,001$ )

A produção de oócitos é uma variável relacionada somente a doadora. No entanto, a produção de blastocistos também pode ter influência do touro utilizado para a fertilização *in vitro*. Foi analisado as taxas de clivagem e de blastocistos em função do touro utilizado, considerando 35 animais diferentes. Houve diferenças entre touros para ambos os parâmetros (Figura 5A e B). É possível observar uma grande variabilidade de resultados entre os touros, existindo uma variação, praticamente de 0% a 100%, para taxa de clivagem e taxa de blastocistos.

Embora exista variação entre touros na PIVE (Guimarães *et al.*, 2014; Morotti *et al.*, 2014; Xu, *et al.*, 2009), a contribuição nos resultados e principalmente como explicação para as variações observadas nos resultados dos mais diversos laboratórios é pequena. No presente estudo, as condições laboratoriais foram as mesmas, incluindo o sistema de cultivo, sendo diferente, além dos touros, as doadoras utilizadas e consequentemente a fonte de oócitos. Como evidenciado nos resultados demonstrado na Tabela 5, a raça da doadora influencia mais nos resultados do que a raça do touro. Somado a isso, já foi demonstrado que a doadora é uma grande fonte de variação por sofrer a influência de diversos fatores, tais como, estado fisiológico, nutrição idade, raça, estresse dentre outros (Baruselli e Gimenes, 2007; Bayeux *et al.*, 2016; Garnsworthy *et al.*, 2008b; Kala e Nivsarkar, 2015; Sartori, Spies e Wiltbank, 2017; Tilly e Sinclair, 2014; Vieira *et al.*, 2014).

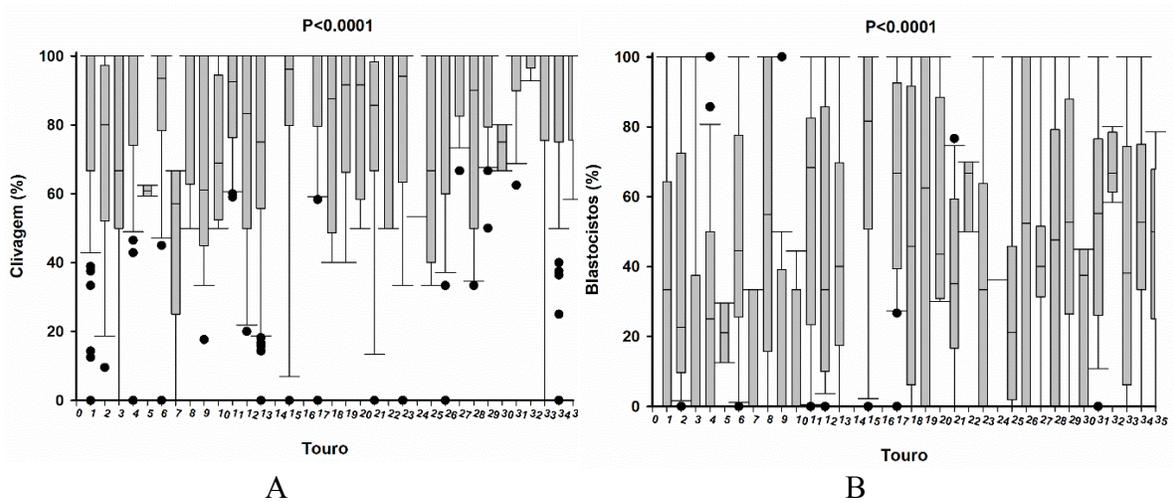


Figura 5: Gráfico BoxPlot das taxas de clivagem (A) e de blastocistos (B) em função do touro utilizado na PIVE (numerados de 1 a 35)

Além de diferentes touros utilizados, existe a possibilidade de utilizar sêmen sexado ou convencional. No presente estudo, foi utilizado, na grande maioria dos trabalhos, sêmen sexado de fêmea por se tratar de uma base de dados obtida de um laboratório com produção de embriões de gado de leite. Considerando taxa de clivagem e taxa de blastocistos, não houve diferenças entre os dois tipos de sêmen utilizados. Embora também exista uma grande variação de resultados dentro de cada tipo de sêmen (Figura 6A e B). A disponibilidade de sêmen sexado, principalmente de fêmea, alavancou a utilização da PIVE em gado de leite (Pontes *et al.*, 2010). Apesar disso, na literatura encontra-se resultados divergentes, nos quais o sêmen sexado apresenta resultados inferiores ao sêmen convencional (Tabela 4 do capítulo II; Obuhci *et al.*, 2019), ou similares ao observados no presente estudo (Morotti *et al.*, 2014). Em algumas situações se observa efeito do tipo de sêmen, sexado ou convencional, como no trabalho de Lopez *et al.*, (2016) que demonstra efeito em função do grupamento genético da doadora, *Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiças (*Bos indicus* X *Bos taurus*). Nos quais para doadoras taurinas ou cruzadas o sêmen sexado foi inferior ao sêmen convencional. Enfatiza-se que a variação de resultados parece estar mais relacionada aos oócitos do que de fato ao tipo de sêmen.

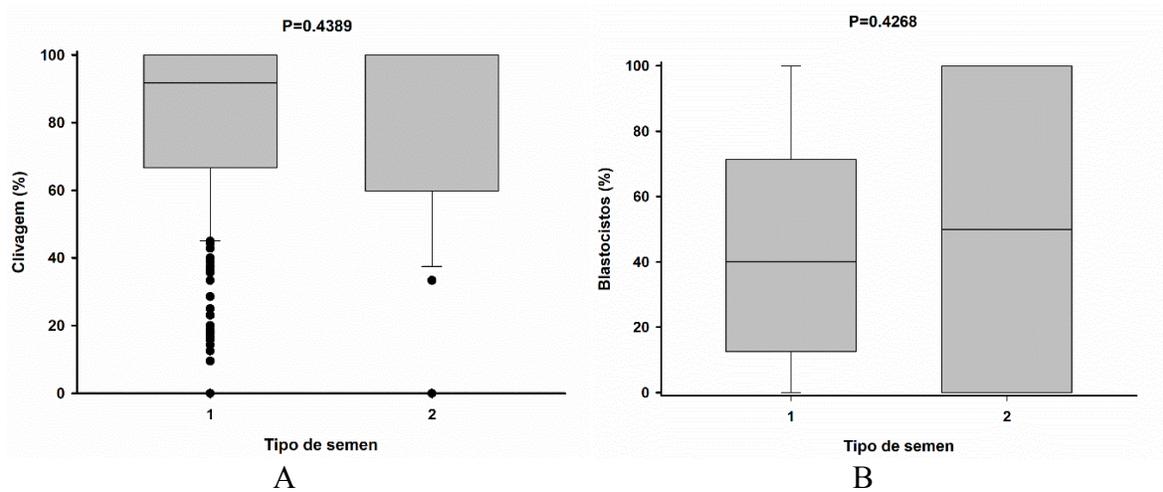


Figura 6: Gráfico BoxPlot das taxas de clivagem (A) e de blastocistos (B) em função do tipo de sêmen utilizado na PIVE (1: sexado, 2: convencional)

#### 4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E PIVE

Dentre os parâmetros espermáticos normalmente analisados para avaliação seminal (Guimarães *et al.*, 2014), nosso estudo utilizou a motilidade (porcentagem de espermatozoides que se movimentam) e vigor (intensidade da movimentação) para avaliar a relação com taxa de clivagem e taxa de blastocistos, como parâmetros da PIVE. Na Tabela 7 estão indicados os parâmetros e os respectivos valores obtidos (médias e variação observadas).

Tabela 7: Análise descritiva dos parâmetros avaliados

| Parâmetro            | Média ± EPM | Varição   |
|----------------------|-------------|-----------|
| Motilidade           | 65,3±1,5    | 40 a 85%  |
| Vigor                | 2,9±0,1     | 2 a 4     |
| Taxa de clivagem     | 70,3±2,6    | 19 a 100% |
| Taxa de blastocistos | 30,2±1,8    | 0 a 69%   |

Foi observado uma correlação significativa entre os parâmetros taxa de clivagem e taxa de blastocistos e motilidade e taxa de blastocistos (Tabela 8). Em ambos os casos é uma correlação positiva, ou seja, a taxa de blastocisto tende a ser maior quando a taxa de clivagem é maior e também quando a motilidade dos espermatozoides é maior. Sendo que a associação entre clivagem e blastocistos é pouco mais forte do que

motilidade e taxa de blastocistos. Não é significativa a associação entre os parâmetros vigor e taxa de blastocistos e motilidade e vigor (Tabela 8). Na fertilização *in vitro*, os oócitos já maturados e os espermatozoides devidamente preparados e capacitados são colocados juntos em um mesmo ambiente (gota de meio de fertilização) sem nenhum obstáculo para que os espermatozoides alcancem os oócitos. Assim como essa situação é diferente do que acontece naturalmente, na qual os espermatozoides precisam superar diversas barreiras no trato reprodutivo feminino, os parâmetros de avaliação espermática também precisam ser diferentes para uso na PIVE. É mais importante que os espermatozoides consigam se mover para realizar a fecundação do que necessariamente a intensidade desses movimentos ou mesmo a concentração espermática nas gotas.

Em laboratórios comerciais, o volume de rotina costuma ser grande e por isso o tempo gasto em cada procedimento deve ser o menor possível, e por essa razão em diversos laboratórios já não se calcula concentração espermática para ajuste de volume para fecundação das gotas. Além disso, a quantidade de oócitos produzidos por cada doadora é bastante variável, conforme já demonstrado (Figura 3). Apesar de já ter sido descrito aumento das taxas de poliespermia com o aumento da concentração de espermatozoides (Demyda-Peyrás *et al.*, 2015), o tempo gasto em cada procedimento, por menor que seja, é bastante prejudicial para os embriões e células (Gardner e Kelley, 2017). Dessa maneira, é importante definir avaliações e parâmetros espermáticos não invasivos e práticos para que possam ser utilizadas em rotinas comerciais de PIVE, tais como a motilidade espermática.

Tabela 8: Análise de associação (método das correlações de Pearson)

| Contrastes                                |  | R     | P      |
|---|--|-------|--------|
| Taxa de clivagem vs. Taxa de blastocistos |  | 0,69  | 0,0001 |
| Motilidade vs. Taxa de blastocistos       |  | 0,47  | 0,0002 |
| Vigor vs. Taxa de blastocistos            |  | 0,18  | 0,2723 |
| Motilidade vs. Vigor                      |  | -0,01 | 0,9623 |

Na figura 7 demonstra a associação entre alguns parâmetros, corroborando os dados da tabela 8. Em trabalhos nas quais há uma alta taxa de clivagem, existe uma forte tendência em ter alta taxa de blastocisto, de forma inversa, quando a taxa de clivagem é baixa (poucos oócitos iniciando o desenvolvimento embrionário), a taxa de

blastocisto será baixa. Com relação ao sêmen, quanto mais espermatozoides se movimentando, o que indica que estão vivos, maior a taxa de blastocisto. Por outro lado, não existe correlação entre vigor do sêmen com taxa de blastocisto (figura 7C). Isso indica que a intensidade dos movimentos dos espermatozoides não indica o sucesso na PIVE, enquanto a motilidade dos mesmos, como um parâmetro de avaliação é um bom indicativo para produção de blastocistos. No entanto, deve-se considerar a influência de fatores relacionados ao preparo do sêmen nesses parâmetros, como velocidade de centrifugação, concentração de heparina e meio de fertilização (Xu *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2014).

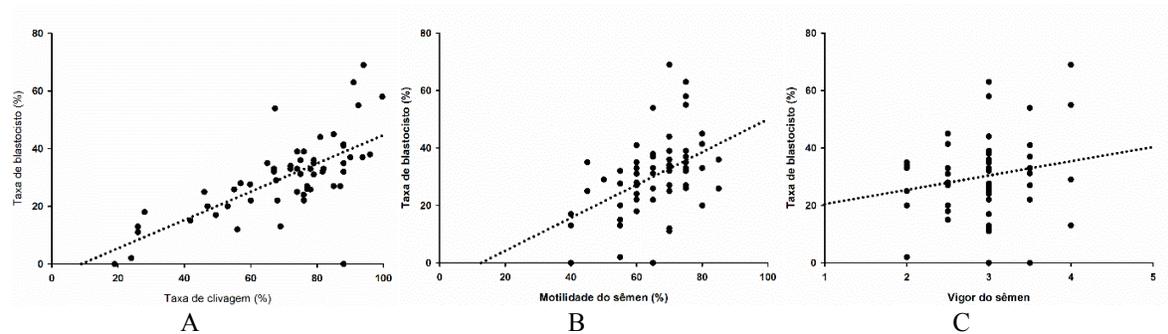


Figure 7: Associação entre taxas de clivagem (A), motilidade (B) e vigor (C) do sêmen, e taxas de blastocistos subsequentes

Agrupando o sêmen por classe de motilidade e vigor, observa-se diferenças na taxa de blastocistos entre as classes de motilidade, enquanto não há diferenças para as classes de vigor (Tabela 9). Dessa maneira, corrobora-se com os demais resultados evidenciando que a motilidade é um melhor parâmetro espermático para se considerar na PIVE do que vigor.

Tabela 9: Taxas de blastocistos na PIVE, distribuídas por classes de motilidade (<60%: I, 60 a 65%: II, >65%: III) e vigor (<3: I, 3: II, >3: III)

| Classe | Motilidade             | Vigor                 |
|--------|------------------------|-----------------------|
| I      | 19,0±3,2 <sup>a</sup>  | 28,0±2,6 <sup>a</sup> |
| II     | 29,0±2,6 <sup>ab</sup> | 29,7±2,7 <sup>a</sup> |
| III    | 35,9±2,6 <sup>b</sup>  | 33,6±4,7 <sup>a</sup> |

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,001)

Vigor: P=0,3445

Motilidade: P=0,0009

## 5. CONCLUSÃO

- A média é pouco informativa para os resultados da PIVE que não apresentam normalidade em sua distribuição;
- A distribuição de produção de oócitos é assimétrica;
- A quantidade de CCO coletados e produção de blastocistos possui associação fraca;
- A raça Gir produz mais blastocistos do que Holandesas, independente da raça do touro;
- Motilidade é melhor que vigor como parâmetro para PIVE

## Capítulo II

### ASPECTOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) COMERCIAL COM FOCO NA GERAÇÃO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO EM RAÇAS DE CORTE

#### RESUMO

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo em número de animais, sendo composto em sua grande maioria por animais comerciais, principalmente destinados a produção de carne. A raça Nelore, compõe a base desse rebanho e se destaca pela boa produção de oócitos e blastocistos no ambiente *in vitro*. Os rebanhos considerados elite, aqueles destinados ao mercado de genética e com animais de alto valor zootécnico e financeiro foram os grandes responsáveis pelo sucesso da PIVE no início dos anos 2000. No entanto, diferente do gado de leite, a produção de embriões *in vitro* destinados a rebanhos comerciais de corte ainda é muito incipiente, embora seja um potencial nicho de mercado. Para isso, é importante pesquisas visando compreender melhor os fatores que afetam os resultados, desde a coleta de oócitos até o nascimento de animais afim de melhorar a eficiência do processo e reduzir custos. Principalmente das perdas gestacionais observadas de embriões produzidos *in vitro*. Diante disso, o objetivo do estudo foi identificar e compreender fontes de variação dos resultados da produção *in vitro* de embriões e transferências de embriões em um programa de grande escala em gado de corte comercial. Foi utilizado para as análises o banco de dados de um laboratório comercial com foco na produção de animais mestiços (Nelore X Angus). Em função da grande quantidade de variáveis não foi possível avaliar todos as possíveis interações. Os subgrupos de dados selecionados foram testados utilizando o modelo estatístico SAS GLIMMIX. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e foi considerado valor de P de 0,05. Foi observado efeito do meio de MIV e da atmosfera de CIV na taxa de blastocistos, enquanto sistema de MIV, do método de preparo do sêmen não teve efeito. Das diversas variáveis analisadas relacionadas a transferências dos embriões, o principal efeito observado nas taxas de gestação e perdas gestacionais foi do estágio de desenvolvimento do embrião (Bi:32,0%, 28,9%, 4,1% ; Bl: 34,1%, 27,4%, 65,%; Bx: 39,9%, 33,4%, 10,6%; Be: 29,3%, 22,4%, 10,3%; para P30, P60 e Aborto respectivamente) enquanto para nascimento e perdas gestacionais foram do mês da estação de monta (1: 6,9%, 21,4%; 2:16,9%, 14,5%; 3: 28,3%, 5,1%; 4: 26,9%, 9,3%; 5: 25,5%, 4,6%; 6: 21,6%, 9,0%; para Parto e aborto respectivamente). Em conclusão, diversos fatores podem afetar a produção de blastocistos e é possível fazer modificações e ajustes de protocolos de forma a maximizar a eficiência do processo de produção de blastocisto. Quanto à TE, a influência das variáveis do laboratório no resultados é menor do que a influência dos meses da estação, principalmente considerando que normalmente se opta por enviar a campo somente blastocistos de boa qualidade e expandido, enquanto as condições ambientais não são possíveis de controlar, na maioria das vezes.

Palavras-chave: PIVE. perdas gestacionais. Gado de corte

## ABSTRACT

*The Brazilian cattle herd is the second largest in the world in number of animals, being mostly composed of commercial animals, mainly intended for meat production. The Nelore breed forms the basis of this herd and highlight for its good oocyte and blastocyst production in the in vitro environment. The elite herds, those destined for the genetics market and those with high zootechnical and financial value, were largely responsible for IVEP's success in the early 2000s. However, unlike dairy cattle, the production of in vitro embryos intended for a commercial beef herd is still very recent, although it is a potential niche market. To this end, research is important to better understand the factors that affect outcomes, from oocyte collection to animal birth in order to improve process efficiency and reduce costs. Mainly from the observed gestational losses of in vitro produced embryos. Therefore, the objective of the study was to identify and understand sources of variation in the results of in vitro embryo production and embryo transfer in a large-scale commercial beef cattle program. A database of a commercial laboratory focused on the production of crossbred animals (Nelore X Angus) was used for the analyzes. Due to the large number of variables, it was not possible to evaluate all possible interactions. The selected subgroups of data were tested using the SAS GLIMMIX statistoc model. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation and a P value of 0.05 was considered. Effect of IVM medium and IVC atmosphere on blastocyst rate was observed, while IVM system, of semen preparation method had no effect. Of the various variables analyzed related to embryo transfer, the main effect observed on pregnancy rates and gestational losses was the embryo development stage (Bi: 32.0%, 28.9%, 4.1%; B1: 34, 1%, 27.4%, 65%; Bx: 39.9%, 33.4%, 10.6%; Be: 29.3%, 22.4%, 10.3%; for P30, P60 and abortion respectively) while for birth and gestational losses were the month of the breeding season (1: 6.9%, 21.4%; 2: 16.9%, 14.5%; 3: 28.3%, 5, 1%; 4: 26.9%, 9.3%; 5: 25.5%, 4.6%; 6: 21.6%, 9.0%; for parturition and abortion respectively). In conclusion, several factors can affect blastocyst production and protocol modifications and adjustments can be made to maximize the efficiency of the blastocyst production process. As for TE, the influence of the laboratory variables on the results is less than the influence of the months of the season, especially considering that it is usually chosen to field only good quality and expanded blastocysts, while environmental conditions are not possible to control.*

*Keywords: IVEP. Pregnant losses . Beef cattle.*

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma das atividades da agropecuária mais difundida em todos os continentes e sendo impactada por diversos fatores como nutrição, sanidade, melhoramento genético e reprodução (Neto *et al.*, 2014). Dentro da reprodução além da monta natural, atualmente existe algumas biotécnicas disponíveis que podem ser utilizadas, tais como inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação e lavagem uterina seguido da transferência dos embriões (MOET) e a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE).

A principal vantagem da PIVE é o aumento significativo no número de crias produzidas pela fêmea (Scanavez, Campos e Santos, 2013). O potencial de multiplicação dessa técnica permite maximizar o uso da fêmea e assim fazer uma pressão de seleção maior nos rebanhos. Além disso, permite a utilização de fêmeas com patologias do trato reprodutivo adquirido, senis, pré-púberes, e até mesmo gestantes, o que seria impraticável naturalmente ou com o uso de outras técnicas. Em função dessas e outras características a PIVE tornou-se uma alternativa viável para a espécie bovina e tem sido utilizada não somente para pesquisas, mas principalmente como atividade comercial (Pontes *et al.*, 2010).

O uso da técnica comercialmente tem aproximadamente 20 anos, iniciando-se em 1999-2000, e ainda hoje, o Brasil é um dos principais produtores de embriões *in vitro* do mundo (Viana *et al.*, 2017). Ao longo desses anos, o perfil de aplicação da tecnologia sofreu algumas mudanças. Inicialmente, a produção de embriões no país era restrita a animais zebuínos, mais especificamente raças de corte, com grande destaque para as raças Nelore e Brahman. A técnica era aplicada aos rebanhos considerados de elite e utilizado nos animais que muitas vezes não respondiam satisfatoriamente aos trabalhos de MOET. Em poucos anos, com bons resultados de produção de blastocistos diversos produtores passaram a adotar a PIVE como técnica de eleição para reprodução dos rebanhos, embora ainda restrita aos rebanhos de corte e de elite. Com a disponibilidade no mercado do sêmen sexado de fêmea, a técnica ganhou um atrativo a mais para um novo nicho de mercado, os produtores de leite. Em pouco anos, com a melhoria dos resultados de produção de embriões utilizado-se sêmen sexado, a técnica

ganhou força também nos rebanhos de leite. Nesse momento, o perfil de utilização da PIVE deixou de ser somente para animais elite e passou para animais de produção, com grande destaque para animais cruzados girolando (Pontes *et al.*, 2010; Grázia *et al.*, 2015).

Apesar de ainda ser considerado por alguns autores como uma tecnologia cara, e que sua utilização em larga escala em rebanhos comerciais fica restrita em função do alto custo, ao tempo requerido nas rotinas de produção e variação de resultados (Scanavez, Campos e Santos, 2013), a técnica já demonstrou um grande potencial de uso. Considerando rebanho brasileiro, composto por 80% de gado Nelore, principalmente de rebanhos comerciais, podemos considerar esse mercado, um potencial nicho para aplicação da PIVE (Pontes *et al.*, 2011). Principalmente sabendo da grande eficiência em produção de embriões *in vitro* de animais Nelore (Pontes *et al.*, 2011). Segundo Viana *et al.* (2017), o uso da transferência de embriões representa somente 0,33% em relação a quantidade de fêmeas em idade reprodutiva. No entanto, em um programa de grande escala de produção *in vitro* de embriões com o objetivo de produzir animais comerciais, os custos de têm sua importância, uma vez que podem impactar no valor final da prenhez. No entanto, a redução não deve ser feita de forma isolada, sem considerar o objetivo principal que são os resultados de produção de embriões e de gestação. Outros fatores, como as perdas embrionárias, preCCOes ou tardias, e o nascimento de animais sem alterações fenotípicas pode representar riscos à rentabilidade da técnica. Dessa maneira, alterações de protocolos laboratoriais, ajustes para uso de sêmen sexado de macho, e outros pontos importantes como fonte de obtenção dos oócitos, estágio de desenvolvimento do embrião, sincronia embriões/receptora, qualidade embrionária, qualidade do corpo lúteo (CL), são aspectos importantes que merecem atenção em programas em grande escala, uma vez que podem afetar as taxas de produção de embriões e nas taxas de gestação (Leal *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2007).

De forma experimental devemos considerar a dificuldade de se realizar estudos de PIVE levando em conta o processo, desde a coleta dos oócitos até o nascimento dos animais. Em função disso, análise de resultados comerciais se tornam uma ferramenta útil para se estudar o desempenho de programas de PIVE em grande escala,

principalmente de embriões utilizando semen sexado de macho, e observando indicadores parciais e completos do processo. Considerando todas as etapas, relacionadas a parte laboratorial como produção de blastocistos e sua relação com as taxas de gestação, até etapas relacionadas ao campo, como perdas gestacionais, precoces e tardias, até nascimento. Ainda há espaço para melhorias e otimização no processo de PIVE (Sartori et al., 2016), principalmente para a aplicação em grande escala em gado de corte comercial, apesar dos grandes avanços alcançados no Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos desse estudo foram:

- Estudar os resultados de produção de blastocistos com sêmen sexado de macho;
- Avaliar a viabilidade técnica de aplicação da produção de embriões *in vitro* em um programa de grande escala em gado de corte comercial;
- Avaliar alterações de protocolo para aumento da eficiência;
- Compreender efeito do embrião nas taxas de gestação e perdas gestacionais;
- Compreender fatores de risco nas taxas e perdas gestacionais extramuros ao laboratório.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 LOCAL E ANIMAIS**

Os resultados apresentados foram obtidos a partir dos resultados do laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos, localizado em Alta Floresta, MT, Latitude 09° 52' 32" S; Longitude 56° 05' 10 W, Altitude 283m. Foram utilizados dados associados ao processo de produção *in vitro* de embriões de animais da raça Nelore provenientes de rebanhos diferentes da região e com histórico reprodutivo (idade, número de aspirações, taxa de produção de oócitos e embriões) desconhecido, uma vez que foram coletados somente os ovários desses animais em frigorífico local. Os resultados relacionados a transferência dos embriões, gestações e perdas gestacionais são provenientes do mesmo laboratório e de duas fazendas na região.



Figura 1: Exemplos de animais da raça Nelore que tiveram os ovários coletados  
Fonte: Arquivo pessoal

### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Consistiu da análise dos resultados da produção *in vitro* de embriões, transferências dos embriões e nascimento dos animais produzidos na estação de monta 2017/2018, compreendendo os meses de outubro de 2017 a março de 2018. Os dados obtidos apresentavam uma grande quantidade de variáveis, e por essa razão, foi realizado uma seleção e somente algumas variáveis foram analisadas. A descrição das variáveis consideradas para inclusão no modelo estatístico está no tópico análise estatística.

### 3.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

#### 3.3.1 Coleta dos complexos cumulus-oócitos (CCO)

Os CCO's foram obtidos de ovários coletados em frigorífico, localizado na cidade de Alta floresta-MT. Os lotes de fêmeas eram selecionados e somente os animais Nelore tiveram seus ovários coletados. Os CCO's foram aspirados de folículos antrais (3 a 8 mm de diâmetro) com auxílio de uma seringa de 10 ml (BD Plastipak, Brasil) com agulha hipodérmicas descartáveis 18G, 40x1,2 (Solidor, China). O líquido folicular e complexos *cumulus*-oócitos foram aspirados para um tubo de 50 mL, 114mmX28mm (Sarstedt, Alemanha) contendo 5 mL de solução fisiológica (HalexStar, Brasil) e aquecido a 36°C. Os CCO's foram classificados segundo Viana et al., 2004, por uma

mesma pessoa, e somente os de Grau I foram considerados para a maturação. As estruturas selecionadas foram lavadas em no próprio meio de maturação *in vitro* (MIV) e posteriormente cultivadas no mesmo meio.

### 3.3.2 Maturação *in vitro* dos complexos cumulus-oócito (CCO)

A maturação *in vitro* dos CCO foi realizada em 3 diferentes meios TCM-199 (GIBCO BRL Invitrogen, Grand Island, NY, USA): 1) Earle`s Salt com L-glutamine e 2,2 g/L de Bicarbonato de sódio (Ref: 11150-059, denominado D1), Dulbecco`s Modified Eagle (DMEM/F12; Ref: D6421 denominado D2), 3) Earle`s Salt com L-glutamina, 2,2 g/L de Bicarbonato de sódio e 25mM HEPES (Ref: 12340-030, denominado D4). Todas as formulações foram suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; GIBCO BRL Invitrogen), 0,2 mM de piruvato de sódio, 50 µg ml<sup>-1</sup> de amicacina, 0,5 µg mL<sup>-1</sup> FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Lavaltrie, Canada) e 100 IU mL<sup>-1</sup> Gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, Brasil). Além disso, teve a adição de 0,1mg/ml de Epidermal Growth Factor (EGF; denominando M4) em algumas composições. Os reagentes adicionados como suplementação foram obtidos da Sigma-Aldrich (St, Louis, USA).

Os oócitos foram mantidos em dois recipients distintos: placas de 35mmX10mm (Corning, NY, USA) em gotas de 90µl ou tubos de polistereno de fundo arredondado de 5 ml (Falcon, Mexico) com volume de 400µl. Foram mantidos em estufa incubadora (Thermo Fisher Scientific, USA) a 38,8 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, por 22 horas.

Na maturação foram realizados comparações dos meios utilizados (4 formulações distintas: D1+M4, D2+M4, D2-M4 e D4-M4) e do sistema de MIV (2 sistemas distintos: maturação em placa e maturação em tubos).

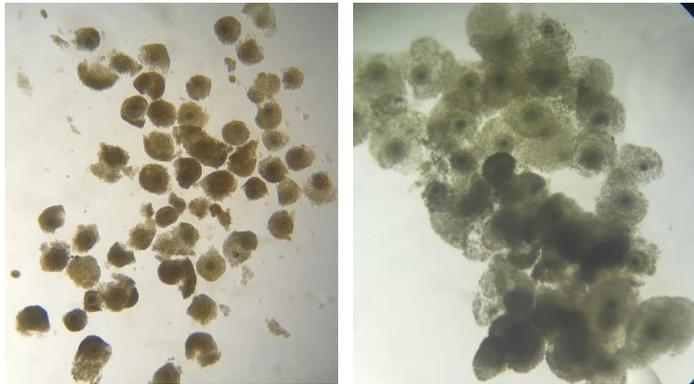


Figura 2: Esquerda: Oócitos imaturos. Direita: Oócitos após 22 horas de maturação (B)  
Fonte: Arquivo pessoal

### 3.3.3 Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

Os CCO maturados foram fecundados utilizando sêmen de touros provados obtidos das centrais especializadas na comercialização de sêmen. Foram utilizados 2 touros diferentes, ambos da raça Aberdeen Angus sexados de macho. Além desses dois touros usados na rotina, foi utilizado como controle interno um semen convencional da raça Nelore.

Foram preparado em placa de Petri de 35mm/10mm (Corning, USA) gotas de 50 $\mu$ l de meio TALP acrescido de 0,2 mM piruvato de sódio, 6 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA), 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sodio, 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de amicacina, 40  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> de solução de PHE (concentrações de 20  $\mu$ M penicilamina, 10  $\mu$ M de hipotaurina e 2  $\mu$ M de epinefrina) e 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de heparina.

O semen foi preparado de duas formas distintas: Gradiente de Percoll (GE Healthcare, Suécia) ou somente lavagem com meio TALP-FIV. As colunas de Percoll preparada com 45% e 90%. Os espermatozoides móveis foram obtidos por centrifugação do semen descongelado 2 vezes a 5.000 rpm, sendo a primeira centrifugação por 5 minutos e a segunda centrifugação por 3 minutos. Para o método utilizando Percoll a primeira centrifugação foi nas colunas e a segunda com meio Talp-FIV, enquanto para o método de lavagem foi utilizado e ambas as centrifugações somente o meio TALP-FIV, porém com metade da concentração de heparina. Os oócitos (no máximo 30 por gota) e os espermatozoides foram co-incubados por

aproximadamente de 18-22 horas a 38.5 C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com humidade maxima. O dia da fertilização foi definido como dia 0.

#### 3.3.4 Cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos

Para o cultivo dos presumíveis zigotos, foi utilizado Sintetic Oviduct Fluid-SOF, contendo soro fetal bovino 3% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; GIBCO BRL Invitrogen) e 3 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA). Os embriões cultivados nas mesmas condições de temperatura e umidade da fecundação, no entanto em 3 atmosferas gasosa distintas: CIV em alta tensão de oxigênio (5% CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> atmosferico), CIV em baixa tensão de oxigênio (5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>) e CIV misto (alta tensão de oxigênio até o terceiro dia de cultivo e baixa tensão após o terceiro dia de cultivo). Foram preparada em placas de Petri de 35mmX10mm (Corning) gotas de 60μL, sob óleo mineral. Após 72 horas do início do cultivo, foi realizado o primeiro *feeding*, que consiste na troca de 50% do meio e a taxa de clivagem avaliada (Figura 3). No sexto dia foi realizado novamente o *feeding*. No sexto e sétimo dia após a fecundação a taxa de blastocisto foi avaliada.

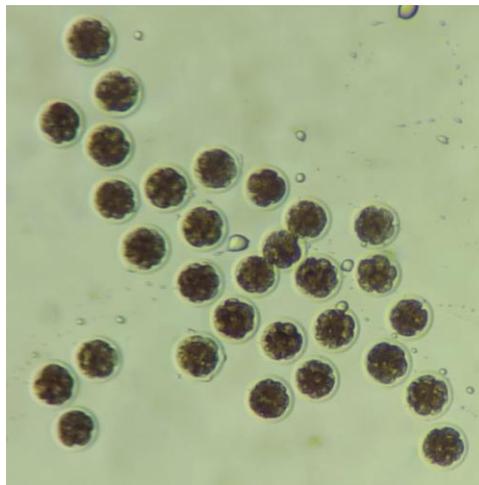


Figura 3: Embriões com divisões celulares avaliadas 48-72 horas após a fertilização (D3)  
Fonte: Arquivo pessoal

Os embriões com 6, 7 ou 8 dias de desenvolvimento foram devidamente classificados com auxílio de microscópio-estereoscópio (Nikon, Japão) quanto sua

qualidade (Grau I ou II) e desenvolvimento (Blastocisto inicial-Bi, blastocisto-BI, Blastocisto expandido-Bx e blastocisto eclodido-Be), conforme imagens abaixo, e preparados para a posterior transferência ou vitrificados. A taxa de embriões considerada em D8 é acumulativa, considerando portanto os blastocistos que já haviam sido avaliados no sexto e sétimo dias. O protocolo de vitrificação, bem como o de desvitrificação consta em anexo (Anexo I).

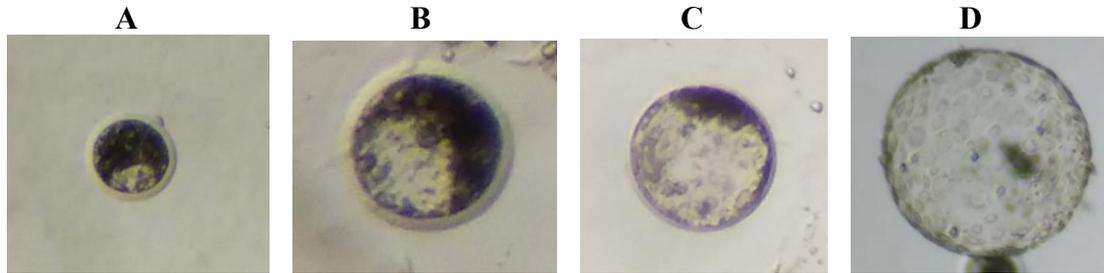


Figura 4 : Embriões em diferentes estágios de blastocistos. Blastocisto inicial-Bi (A), Blastocisto-BI (B), Blastocisto expandido-Bx (C), Blastocisto eclodido-Be (D)

Fonte: Arquivo pessoal

Os embriões transferidos a fresco, quanto os que foram desvitrificados para transferência, foram envasados em palhetas de 0,25ml (Minitube, Alemanha) com meio SOF acrescido de 0,0007g/ml de HEPES e suplementado com 5% (v/v) de SFB (GIBCO, BRL Invitrogen) e 3 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA). O transporte do laboratório até o local de transferência se deu em transportadora de embriões (WTA, Cravinhos, Brasil) a 36.5 graus.



Figura 5: Esquerda: Embriões devidamente envasados individualmente em palhetas de 0,25ml. Direita: Palhetas com os embriões dispostos na transportadora de embriões.

Fonte: Arquivo pessoal

No cultivo foram realizadas comparações da atmosfera utilizada (3 atmosferas distintas: alta tensão de O<sub>2</sub>, baixa tensão de O<sub>2</sub>, e alta tensão até o terceiro dia e baixa tensão após o terceiro dia) na produção de blastocistos. Além disso, foi realizada comparações da fase do desenvolvimento (4 fases distintas: Bi, Bl, Bx e Be), dia de desenvolvimento (3 dias distintos: Sexto dia, sétimo dia e oitavo dia) e o tipo de embrião utilizado na transferência (2 tipos distintos: fresco ou vitrificado).

### 3.4 PREPARO DAS RECEPTORAS

Os animais foram todos avaliados antes de se iniciar o protocolo hormonal de sincronização de estro. Animais que apresentavam ciclicidade foram selecionados para iniciar o protocolo. O protocolo de sincronização do estro das receptoras iniciou-se no dia zero (D0) com a inserção do dispositivo intravaginal com 1,9g de progesterona (CIDR) e aplicação intramuscular de 2mg (2ml) de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol). No sétimo dia (D7), foi feita uma aplicação intramuscular de 2,5 ml de prostaglandina F2 $\alpha$  (Lutalyse). No nono dia (D9) o dispositivo de progesterona foi retirado e realizado a aplicação via intramuscular de 300 UI (1,5ml) de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon) juntamente com 0,6mg (0,3 ml) de cipionato de estradiol (ECP) (Figura 6). No décimo oitavo dia (D18) as receptoras que responderam ao protocolo, que apresentavam CL, receberam os embriões (Figura 7). Todos os medicamentos necessários foram obtidos da Zoetis (Nova Jersey, USA).

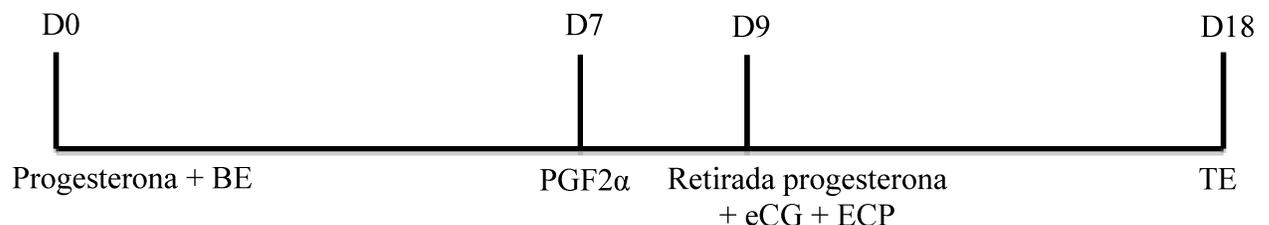


Figura 6: Esquema do protocolo de sincronização de estro utilizado nas receptoras

Os animais foram classificados quanto a ordem de paridade (Novilha, primípara, plurípara e não lactante) e quanto o grupamento racial (Cruzado e zebuíno).



Figura 7: Receptoras de embriões que foram utilizadas para receber embriões  
Fonte: Arquivo pessoal

### 3.5 TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES

No dia da transferência dos embriões (TE) as receptoras que foram protocoladas foram avaliadas por palpação retal e quando necessário com o auxílio de ultrassonografia transretal (Mindray 2200 com transdutor linear 7,5-MHz, Toquio, Japão) e os animais que apresentavam corpo lúteo em algum dos ovários foram selecionadas para receberem os embriões. Após a detecção do CL, foi feita uma classificação do mesmo considerando o tamanho por palpação retal, no qual foi considerado como grande, médio e pequeno. Os animais que não responderam ao protocolo foram separadas em um novo lote para realização de um novo protocolo posterior. Os embriões devidamente envasados foram preparados para transferência utilizando baina para TE descartável (WTA, Cravinhos, Brasil) e camisinha sanitária 21 polegadas (Minitube, Alemanha). O procedimento da transferência foi realizado após anestesia epidural sacrocócea com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstrictor (epinefrina), do animal por um técnico devidamente capacitado. A vulva foi higienizada com água corrente e papel toalha. O embrião foi depositado no corno uterino ipsilateral ao ovário com a presença do corpo lúteo (CL).

### 3.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL

As fêmeas foram avaliadas utilizando ultrassonografia transretal (Mindray 2200 com transdutor linear X-MHz, Toquio, Japão) entre 23 e 28 dias após a transferência

dos embriões (definido como P30) e entre 55 e 59 dias após a transferência dos embriões (definido como P60) para determinar o status de gestação e confirmar o sexo fetal.

### 3.7 NASCIMENTO DOS ANIMAIS

Todas as informações relacionadas ao nascimento dos animais foram cedidos pelas fazendas. Foi registrado o nascimento de animais dentro de um período de 30 dias, definindo como lote todos os animais que tiveram parição dentro desse período pré-estabelecido pela própria fazenda. Foi registrado somente o sexo do animal nascido e o número das receptoras de cada lote que tiveram cria. Não teve nenhuma identificação dos animais nascidos.



Figura 8: Receptoras de embriões com os bezerros ao pé  
Fonte: Arquivo pessoal

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram analisados um total de 607 sessões de produção *in vitro* de embriões, utilizando 15.115 oócitos. Utilizou-se o modelo estatístico SAS GLIMMIX (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), com ajuste para distribuição de dados tipo central. O modelo estatístico incluiu os efeitos principais de método de maturação *in vitro* (tubo ou placa), meio de MIV (4 formulações), atmosfera de CIV (alta tensão de O<sub>2</sub>, baixa tensão de O<sub>2</sub>, e alta tensão + baixa tensão no cultivo), touro e

método de separação do sêmen (percoll ou lavagem), e os efeitos aleatórios de sessão de PIVE, placa e gota de cultivo. Como resultados, considerou-se a taxa de clivagem, as taxas de embriões no dia 7 e 8 (acumulado), e o número de embriões produzidos por gota de cultivo. Avaliou-se ainda o percentual de embriões no dia 7 em cada fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com o meio de CIV, a atmosfera de cultivo e a forma de preparação do sêmen. Em função da distribuição irregular dos dados, não foi possível testar todos os possíveis efeitos de interação. Desta forma, optou-se por realizar as análises em subgrupos de dados, filtrados de forma a padronizar a(s) variável(eis) com potencial interação com o parâmetro em análise.

Para análise dos dados relativos as transferências de embriões, foram utilizados dados de um total de 2.543 inovulações. Utilizou-se o modelo estatístico SAS GLIMMIX (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), com ajuste para distribuição de dados binomial. O modelo estatístico incluiu os efeitos principais do mês na estação de transferência, fazenda, ordem de inovulação por dia de TE, número de inovulações recebidas por receptora, raça, paridade e escore de condição corporal da receptora, número de usos do implante de progesterona, touro usado na PIVE, estágio de desenvolvimento e dia do embrião transferido, posição e classificação do corpo lúteo, e técnico responsável pela transferência do embrião, e o efeito aleatório da receptora. Em função do pequeno número, foram removidos da análise principal os dados de embriões criopreservados, assim como os de um touro e um técnico. Os demais efeitos foram analisados em 2.450 transferências. Os efeitos de número de inovulações recebidas por receptora e número de usos do implante de progesterona apresentaram confundimento com o mês da estação de transferência, e foram posteriormente removidos do modelo. Como resultados, considerou-se as taxas de prenhez aos 30 (P30) e 60 dias (P60), as taxas de nascimento (Parto), o percentual de perdas de 30 a 60 dias (PEP), de 60 dias ao parto (Aborto), e as perdas totais (Total).

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O valor de P de 0,05 foi utilizado para determinar diferenças significativas.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados desse capítulo foram divididos em duas partes. A primeira parte referente a produção *in vitro* de embriões, ligada mais diretamente a parte laboratorial. Enquanto a segunda parte referente a transferência dos embriões até ao nascimento, mais associada ao trabalho do campo.

#### 4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

Foi realizado uma análise considerando todas as variáveis selecionadas para o estudo, suas interações e os possíveis efeitos nos parâmetros determinados (Taxa de clivagem, Taxa de embriões (D7), Taxa de embriões (D8), Embriões GI por gota de CIV), utilizando o modelo estatístico SAS GLIMMIX. Com esse modelo foi possível avaliar os principais efeitos que poderiam explicar os resultados encontrados, levando em consideração de maneira geral todas as possibilidades, independente da natureza dos dados e sua distribuição. Por essa razão poderia existir efeito de confundimento, por exemplo, no método de MIV poderia ser observado diferença, mas a diferença poderia ser melhor explicada em função do meio de MIV utilizado e não em função do método. A análise de efeitos principais permitiu observar quais variáveis tem efeito e sobre quais parâmetros de forma mais ampla (Tabela 1). Assim sendo, determinado a existência de efeito, foi realizado análises individuais para cada variável para determinar onde estava a diferença e qual era a diferença dentro de cada variável.

Tabela 1: Análise de efeitos principais sobre a PIVE com sêmen sexado para macho

| Efeitos                   | Significância (P) |                       |                       |                             |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
|                           | Taxa de clivagem  | Taxa de embriões (D7) | Taxa de embriões (D8) | Embriões GI por gota de CIV |
| Método de MIV             | <0,0001           | 0,0861                | <b>0,0179</b>         | <b>0,0001</b>               |
| Meio de MIV               | <b>0,0006</b>     | <b>0,0001</b>         | <0,0001               | <0,0001                     |
| Atmosfera de CIV          | 0,1008            | 0,0414                | <0,0001               | <0,0001                     |
| Método de MIV * Atmosfera | <b>0,0170</b>     | 0,0800                | 0,4739                | 0,6426                      |
| Touro                     | <0,0001           | <0,0001               | <0,0001               | <0,0001                     |
| Touro * Atmosfera         | <0,0001           | 0,0236                | 0,3959                | <b>0,0018</b>               |
| Preparação do sêmen       | 0,0346            | 0,0568                | <b>0,0137</b>         | <b>0,0146</b>               |
| Touro * Preparação        | <0,0001           | 0,1483                | 0,3528                | 0,6508                      |

A taxa de blastocistos no sétimo dia e no oitavo dia não apresentou diferenças entre os dois sistemas de MIV, seja placa de Petri ou tubo de fundo arredondado tipo

Falcon de 5 ml (Tabela 2). No entanto, a taxa de clivagem e os blastocistos considerados de melhor qualidade (Grau I) foram maiores quando a maturação dos oócitos ocorreram em tubos conforme indicado na Tabela 2. Rotineiramente os laboratórios utilizam a maturação em tubos uma vez que a aspiração ocorre nas fazendas e ainda é necessário o deslocamento até ao laboratório. No entanto, em uma rotina na qual a coleta dos oócitos é feita no próprio laboratório existe a possibilidade de realizar a maturação em placas de Petri ao invés de tubos de 1.5 ml ou 5 ml. A maturação é o primeiro passo da produção *in vitro* de embriões e é importante que ocorra em condições satisfatórias para que as taxas e a qualidade de blastocistos sejam boas (Lonergan e Fair, 2016). Entre outras coisas, o recipiente pode influenciar na maturação e conseqüentemente nas etapas seguintes. No trabalho de Suttirojpatana *et al.*, (2017) não houve diferença entre a maturação realizada em tubos ou placas, embora tenha encontrado influência dos materiais utilizados na MIV. No presente estudo a diferença encontrada pode ter sido em função do volume de meio de maturação disponível. A composição do meio de maturação foi a mesma, assim como a quantidade de oócitos colocados para maturar. Porém nas placas a gota de maturação tinha 90 microlitros enquanto nos tubos foram feitos com 400 microlitros, conseqüentemente uma razão volume de meio/oócitos quase 4,5 vezes maior na maturação em tubos. Embora o volume de meio de MIV utilizado nos tubos seja maior do que nas placas, se produziu embriões de melhor qualidade, o que pode representar um bom custo benefício.

Tabela 2: Efeito do sistema de MIV do oócitos nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP]

| Método de MIV | N (CCO) | Taxa de clivagem | Taxa de embriões (D7) | Taxa de embriões (D8) | Embriões GI por gota de CIV |
|---------------|---------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Placa         | 2.631   | 46,1±1,6 a       | 10,8±0,8 a            | 14,3±1,0 a            | 3,6±0,3 a                   |
| Tubo          | 2.174   | 54,0±2,1 b       | 11,8±1,0 a            | 14,8±1,1 a            | 4,4±0,3 b                   |

\* Cultivo em meio D1+M4, sêmen sexado, touros 1 e 2, preparação por percoll  
Dados de 179 sessões de PIVE

O meio utilizado pela grande maioria dos laboratórios para MIV é o TCM 199 (*tissue culture medium* 199) suplementado com fonte proteica, hormônios e fatores de crescimento (Lonergan e Fair, 2017). Das 4 formulações distintas, considerando o TCM

199 e a presença ou ausência de M4 (EGF, *epidermal growth fator*), dois deles (D1+M4 e D2-M4) apresentaram melhores resultados de clivagem, blastocistos em D7 e D8 e também de embriões de grau I (Tabela 3). Dessas duas formulações que apresentaram os melhores resultados, a D2-M4 foi a que apresentou a maior taxa de blastocistos em D7, embora o grupo maturado em D1+M4 tenha apresentado a mesma taxa total de blastocistos e embriões de mesma qualidade do grupo D2-M4. Possivelmente, os embriões do grupo D1+M4 apresentaram uma cinética mais lenta, e no sétimo dia ainda não haviam todos alcançado o estágio de blastocisto, o que não prejudicou a produção e a qualidade. O grupo que apresentou os menores resultados foi o D4-M4 (Tabela 3). A MIV é o primeiro passo da PIVE após a obtenção dos oócitos, e por isso tem um importante papel nos resultados de produção de blastocistos, no entanto, a grande maioria dos laboratórios utilizam meios relativamente simples que não apresentam grandes mudanças há aproximadamente 30 anos (Lonergan e Fair, 2017). Em função disso, possivelmente muito das composições de meios utilizadas atualmente pode apresentar componentes sem muito impacto nas taxas de blastocistos e sua qualidade ou mesmo componentes em concentrações além do necessário. Além disso, a base dos meios de maturação são os TCM 199, e há uma variedade razoável disponível no mercado, o que pode ter impacto nos resultados, associação com outros componentes e impacto nos custos de produção.

Tabela 3: Efeito de diferentes formulações do meio de MIV nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média  $\pm$  DP]

| Meio  | N<br>(CCO) | Taxa de<br>clivagem | Taxa de<br>embriões (D7) | Taxa de<br>embriões (D8) | Embriões GI por<br>gota de CIV |
|-------|------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| D1+M4 | 3.112      | 53,2 $\pm$ 1,4 a    | 16,9 $\pm$ 0,9 b         | 25,0 $\pm$ 1,1 a         | 6,2 $\pm$ 0,3 a                |
| D2+M4 | 2.716      | 44,8 $\pm$ 1,3 b    | 14,2 $\pm$ 0,9 c         | 20,0 $\pm$ 1,1 b         | 5,0 $\pm$ 0,3 b                |
| D2-M4 | 1.775      | 51,0 $\pm$ 1,6 a    | 19,6 $\pm$ 1,1 a         | 25,2 $\pm$ 1,4 a         | 6,3 $\pm$ 0,3 a                |
| D4-M4 | 300        | 41,9 $\pm$ 3,5 b    | 9,1 $\pm$ 2,0 d          | 12,7 $\pm$ 2,5 c         | 2,6 $\pm$ 0,6 c                |

\* Cultivo em placa, touro 1, sêmen sexado, preparação por lavagem, atmosfera A+B  
Dados de 319 sessões de PIVE

Avaliando o estágio de desenvolvimento dos embriões produzidos a partir de oócitos maturados nas quatro formulações do meio de MIV, se observa que não houve diferença entre na quantidade de Bx e B1 (Figura 9). O meio D1+M4 não apresentou

nenhum Be e o D2+M4 teve menor quantidade comparado aos outros dois (D2-M4 e D4-M4). Já para Bi o grupo D4-M4 foi o que apresentou maior quantidade (Figura 9). As composições que não apresentaram EGF na sua formulação apresentaram maior quantidade de BE no sétimo dia. Já foi demonstrado que a suplementação do meio de maturação com EGF apresenta efeitos na competência meiótica, perfil proteico, competência de desenvolvimento e aumenta a maturação nuclear (Ríos *et al.*, 2015). No mesmo estudo encontraram um pequeno atraso na cinética de desenvolvimento em oócitos maturados na presença do EGF. Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, os quais encontrou efeito do EGF na cinética do desenvolvimento.

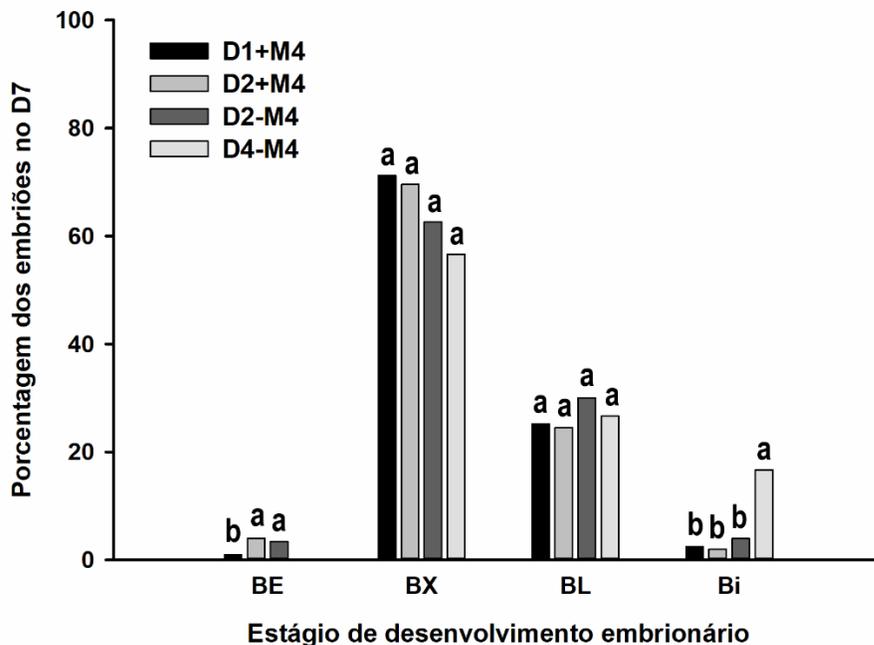


Figura 9: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com o meio utilizado na MIV dos oócitos

Os nossos resultados foram obtidos com sêmen de touros Aberding Angus e foi encontrado diferença entre sêmen sexado e convencional nas taxas de clivagem, embriões em D7 e D8 e também na quantidade de embriões de melhor qualidade produzidos (Tabela 4). Na bovinocultura de maneira geral, a possibilidade de aumentar o nascimento de animais de um determinado sexo se torna interessante e um atrativo a

mais no uso de sêmen sexado. Especificamente no caso da bovinocultura de corte, a qual ainda utiliza basicamente touros e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) como estratégia reprodutiva. Embora a tecnologia de IATF possui diversas vantagens os resultados com sêmen sexado ainda apresenta baixas taxas de gestação quando comparados com o sêmen convencional (Noonan, Kelly e Beggs, 2016). Além disso, o valor de uma dose de sêmen sexado disponível no mercado muitas vezes inviabiliza a sua utilização na IATF. Diante disso, a possibilidade de nascimentos de aproximadamente 95% de machos conforme já demonstrado por Pellegrino *et al.*, (2016) e o baixo gasto com sêmen (1 dose de sêmen sexado fertiliza aproximadamente 300 oócitos com o protocolo utilizado no presente trabalho) faz da técnica de PIVE-TETF uma possibilidade cada vez mais real nos rebanhos comerciais de corte. Ainda no estudo de Pellegrino *et al.* (2016), foi demonstrado a viabilidade de produção em grande escala usando ovários de abatedouros e sêmen sexado para produção de bezerros machos a baixo custo para rebanhos de corte. No entanto, os resultados de produção de embriões *in vitro* com sêmen sexado ainda é mais baixo do que sêmen convencional conforme demonstrado no presente estudo. Além dos resultados de produção de blastocistos, já foi relatado taxas de prenhez mais baixas com embrião produzido utilizando sêmen sexado comparado ao convencional (Mikkola, Andersson e Taponen, 2015). Por outro lado, em um outro trabalho recente foi demonstrado que a PIVE com sêmen sexado é uma estratégia de aumento da eficiência e redução dos custos na produção de bezerros, quando comparados com a MOET (Morotti *et al.*, 2014; Obuchi *et al.*, 2019), outra ferramenta de melhoramento genético utilizada, principalmente em animais taurinos (Obuchi *et al.*, 2019). De maneira geral, é uma boa ferramenta disponível para ser utilizada, e a definição do uso vai depender das condições e objetivos da aplicação.

Tabela 4: Efeito do tipo de sêmen nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP]

| Sêmen        | N<br>(CCO) | Taxa de<br>clivagem | Taxa de<br>embriões (D7) | Taxa de<br>embriões (D8) | Embriões GI por<br>gota de CIV |
|--------------|------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Sexado       | 14.560     | 48,2±0,6 a          | 14,1±0,4 a               | 19,1±0,5 a               | 4,8±0,1 a                      |
| Convencional | 555        | 62,3±2,8 b          | 27,8±2,2 b               | 36,4±2,6 b               | 8,9±0,7 b                      |

Dados de 604 sessões de PIVE

Utilizando somente o sêmen sexado para produção dos embriões, foi avaliado dois métodos de preparo do sêmen. Gradiente de densidade Percoll e centrifugação somente com meio TALP-FIV (Lavagem). Não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados entre os dois grupos (Tabela 5). O Percoll consiste de partículas de sílica revestidas com Polivinilpirrolidona (PVP) e é amplamente utilizado para selecionar células por centrifugação (Lee *et al.*, 2009; Oshio, 1988). No caso específico de células espermáticas é considerado o melhor método para separação de espermatozoides, aumentando a motilidade progressiva (Mehmood, Anwar e Naqvi, 2009). É o método mais utilizado nos laboratórios de PIVE em bovinos para preparo do sêmen (Lee *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2009). Entretanto, já foi relatado que o PVP tem efeitos deletérios nos espermatozoides e embrião (Strehler *et al.*, 1998; Vos, De *et al.*, 1997). No trabalho de Oliveira *et al.*, (2012) avaliaram o efeito da centrifugação no gradiente de Percoll e observou a seleção de espermatozoides móveis com membrana plasmática intacta e alta funcionalidade mitocondrial. Porém, a centrifugação e/ou Percoll influenciou na integridade da membrana acrossomal, aumentando a quantidade de espermatozoides com essa membrana danificada (Oliveira *et al.*, 2012). No referido trabalho, se avaliou somente os parâmetros seminais quando centrifugado com Percoll comparado com sêmen pós descongelamento. Diferentemente, no presente estudo se avaliou efeitos do preparo do sêmen com Percoll e sem Percoll, ambos centrifugados nas mesmas condições, sobre a produção de embriões *in vitro*. Apesar dos efeitos deletérios do Percoll nas células espermáticas já descritos na literatura, nossos resultados demonstram que a retirada do Percoll do protocolo de preparo do sêmen não afetou as taxas de clivagem, taxa de embriões em D7 e D8 e na qualidade dos embriões produzidos, se mantendo igual ao preparo somente com lavagem (Tabela 5). De forma similar, Dode *et al.* (2002) não encontraram efeito prejudicial sobre a fertilização comparando três formas de preparo de sêmen, entre elas Percoll e lavagem. Porém, existe uma variação entre touros (Alomar *et al.*, 2008; Palma e Sinowatz, 2004; Samardzija *et al.*, 2006) e alguns indivíduos apresentaram mais sensibilidade ao Percoll, levando a uma capacitação a reação acrossomica preCCOe. Como consequência, pode afetar os resultados da PIVE (Chamberland *et al.*, 2001). Isso reforça a necessidade de ajustes de protocolo em função das raças trabalhadas, cruzamentos utilizados e objetivos

almejados.

Tabela 5: Efeito do método de preparação do sêmen nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP]

| Método  | N (CCO) | Taxa de clivagem | Taxa de embriões (D7) | Taxa de embriões (D8) | Embriões GI por gota de CIV |
|---------|---------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Percoll | 921     | 49,5±2,4 a       | 15,0±1,5 a            | 21,5±1,8 a            | 5,4±0,5 a                   |
| Lavagem | 3.112   | 53,1±1,5 a       | 16,9±0,9 a            | 25,0±1,1 a            | 6,2±0,3 a                   |

\* Cultivo em placa, meio D1+M4, touro 1, sêmen sexado, atmosfera A+B  
Dados de 162 sessões de PIVE

Avaliando o efeito do método de preparo do sêmen por estágio de desenvolvimento no sétimo dia, o qual é feito a transferência dos embriões, se observa uma diferença entre os dois grupos. Os estágios de blastocisto expandido (Bx) se apresentou em maior quantidade no grupo que foi realizado o preparo do sêmen através de lavagem, enquanto blastocisto eclodido (Be) se apresentaram maior no grupo Percoll. Já os estágios de blastocisto inicial (Bi) e Blastocisto (Bl) não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 10). Embora não tenha sido observado nenhuma diferença entre os grupos nos parâmetros relacionados a PIVE, foi encontrado diferenças no estágio de desenvolvimento dos embriões que foram produzidos. Sabendo que o estágio de desenvolvimento dos embriões pode ter impacto nas taxas de gestação, conforme demonstrado na Tabela 20, o preparo do sêmen pode ser fonte de variação e ter influência nos resultados. O estágio de desenvolvimento que é preferencialmente selecionado para a transferência são os Bx, em seguida sendo Be e Bl e por último, o Bi. Porém, a maior quantidade de blastocisto expandido encontrado no grupo lavagem pode ser benéfico para as taxas de gestação. O estágio de desenvolvimento pode ser utilizado como um parâmetro de avaliação da qualidade embrionária em rotinas comerciais. O estágio de blastocisto eclodido pode ser um embrião com uma cinética de desenvolvimento mais acelerado e além disso, em função da eclosão é um embrião que apresenta menos proteção, uma vez que já não tem mais zona pelúcida (ZP).

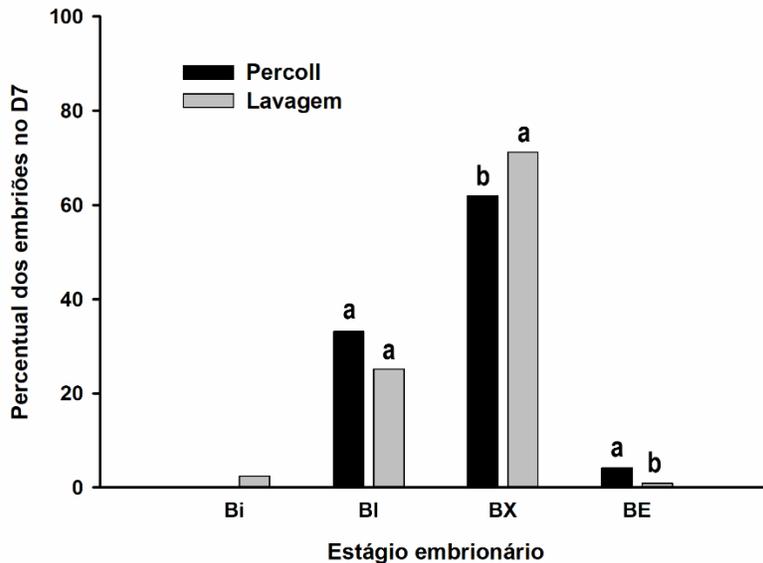


Figura 10: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com o método de preparo de sêmen

A terceira etapa da PIVE, o cultivo *in vitro*, foi realizado de três formas distintas. A atmosfera mista, CIV em alta tensão até o terceiro dia e CIV em baixa tensão após o terceiro dia, foi a que apresentou melhor taxa de embriões em D7 e D8 e maior quantidade de embriões de boa qualidade (Tabela 6). Para a taxa de clivagem a atmosfera mista se apresentou igual ao CIV em alta tensão. Em todos os parâmetros o cultivo de baixa tensão de O<sub>2</sub> foi inferior (Tabela 6). O cultivo de embriões é uma das etapas que vem sendo estudada com o objetivo de melhorar as taxas de produção de embriões e de prenhez. Diversas formas de cultivo podem ser utilizadas, sendo uma das mais empregadas o co-cultivo com células somáticas oriunda dos próprios folículos, as células da granulosa ou células do *cumulus* que permanecem ao redor dos oócitos. Sabe-se que as células do *cumulus* contribuem na maturação do oócito e para melhores taxas de clivagem e desenvolvimento dos embriões de bovinos, ovinos e até de bubalinos (Yadav *et al.*, 2000). Por outro lado, o cultivo em baixa tensão oferece um ambiente com menor concentração de oxigênio e conseqüentemente menor oxidação. Isso leva a um menor estresse oxidativo que poderá refletir na qualidade dos embriões, uma vez que esse estresse pode causar morte celular, marcações epigenéticas, danos em organelas entre outros (Gardner e Kelley, 2017). Além disso, em uma rotina comercial o

custo dos procedimentos deve se levado em consideração, e não apenas a eficiência do processo. Para estabelecer uma baixa concentração de oxigênio é necessário injetar nitrogênio gasoso na incubadora, na grande maioria das vezes, e o consumo vai depender da frequência de uso do equipamento. Em programas de grande escala, a frequência de uso normalmente é alta o que leva a um aumento do consumo, refletindo no aumento do custo. Além disso, para os cultivos de baixa tensão há necessidade de remoção total das células do cumulus, que pode ser feito de forma enzimática, mecânica ou ainda mecânica-enzimática. Comumente se utiliza o desnudamento mecânico por pipetagens. Esse processo de retirada das células que se utiliza pode ocasionalmente causar danos celulares ao possível zigoto, provocando deslocamento dos pró-núcleos que pode prejudicar o desenvolvimento embrionário subsequente. Dessa maneira, o cultivo misto se mostrou eficiente, uma vez que utiliza as duas formas de cultivo. Se aproveitando do benefício da baixa tensão em reduzir o estresse oxidativo e também ao evitar o desnudamento mecânico dos óocitos que é possível no cultivo de alta tensão. Somado a isso, reduz a frequência de uso das incubadoras e conseqüentemente reduz consumo.

Tabela 6: Efeito da atmosfera gasosa de cultivo dos embriões nos parâmetros de clivagem, produção e qualidade de blastocistos [Média ± DP]

| Tensão de O <sub>2</sub>               | N<br>(CCO) | Taxa de<br>clivagem | Taxa de<br>embriões (D7) | Taxa de<br>embriões (D8) | Embriões<br>GI por gota<br>de CIV |
|--|------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Alta                                   | 866        | 47,7±2,4 a          | 10,4±1,4 b               | 12,8±1,6 b               | 3,2±0,4 b                         |
| Baixa                                  | 846        | 32,5±4,2 b          | 6,3±1,6 b                | 7,8±1,8 c                | 1,9±0,5 c                         |
| Alta (até o D3) +<br>Baixa (após o D3) | 4.133      | 51,5±1,3 a          | 16,1±0,7 a               | 23,6±0,9 a               | 5,9±0,2 a                         |

\* Cultivo em placa, meio D1+M4, sêmen sexado  
Dados de 233 sessões de PIVE

Avaliando a qualidade dos embriões produzidos com base no desenvolvimento, observamos uma maior quantidade de Bx no cultivo misto, embora tenha sido igual ao cultivo em baixa tensão de oxigênio. Já a quantidade de Be foi maior no cultivo de baixa tensão quando comparado no cultivo misto. O cultivo de alta tensão não produziu nenhum Be e foi o grupo que apresentou menor quantidade de Bx. Por outro lado, no cultivo de alta tensão a quantidade de Bi e Bl foram maiores do que os outros dois

grupos, que não tiveram diferenças entre si (Figura 11). Esse resultado demonstra que apesar de apresentar menor produção de embriões, o cultivo em baixa tensão foi o que apresentou os embriões de melhor qualidade. O cultivo misto, demonstrou ser uma alternativa válida, uma vez que apresentou as maiores taxas de produção de embriões e apresentou embriões de qualidade similar ao cultivo em baixa tensão, diferindo apenas na quantidade de blastocistos eclodidos. Já o cultivo de alta tensão tem taxas de embriões similares ao cultivo misto, embora tenha sido o grupo que apresentou os embriões de pior qualidade.

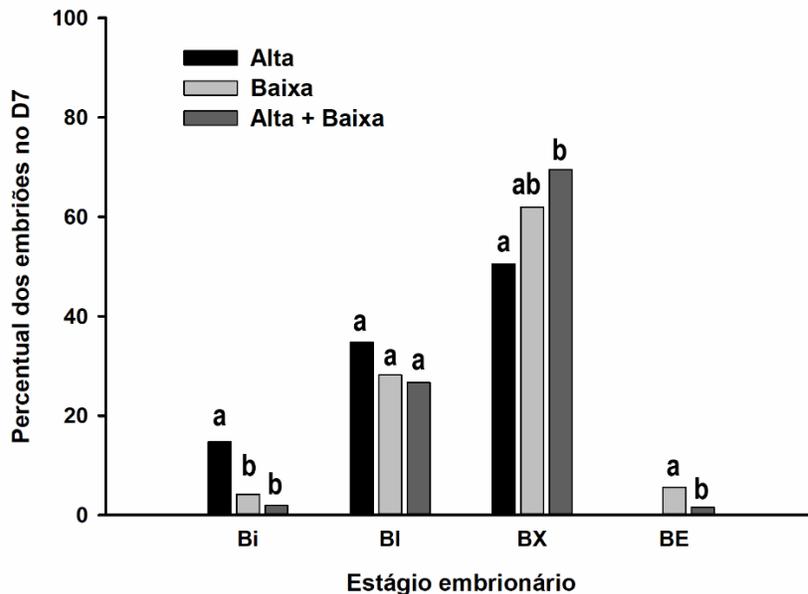


Figura 11: Percentual dos embriões no dia 7 por fase de desenvolvimento embrionário, de acordo com a atmosfera de cultivo in vitro

#### 4.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)

Em função da grande diferença entre os grupos, embriões frescos e embriões vitrificados, não foi possível realizar nenhum teste estatístico para avaliar possíveis diferenças entre eles. Porém, com intuito informativo a Tabela 7 demonstra os parâmetros de prenhez aos 30 dias, prenhez aos 60 dias, nascimentos (Parto), perda embrionária preCCOe (PEP), aborto e perdas totais (Total) considerando dois tipos de embriões transferidos utilizados em uma rotina comercial. Resultado similar ao encontrado no presente estudo já foi relatado na literatura (Mikkola, Andersson e

Taponen, 2015; Sanches *et al.*, 2016). A estratégia do uso de embriões congelados pode ser adotada em função de diversas situações, como pequenos rebanhos, quantidade limitada de receptoras, falta de uma estação de monta definida ou mesmo comercialização de genética, incluindo o mercado externo (Sartori *et al.*, 2016; Viana *et al.*, 2017).

Tabela 7: Efeito da criopreservação nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Tipo de TE     | N     | P30  | P60  | Parto | PEP | Aborto | Total |
|----------------|-------|------|------|-------|-----|--------|-------|
| Fresco         | 2.505 | 37,9 | 31,5 | 22,0  | 6,4 | 9,5    | 16,0  |
| Desvitrificado | 38    | 31,6 | 28,9 | 18,4  | 2,6 | 10,5   | 13,2  |

A análise de efeitos principais demonstra de maneira geral as variáveis que podem explicar a variação de resultado dos parâmetros analisados (Tabela 8). Essa análise levou em consideração todas as variáveis que poderiam explicar as variações de resultados de forma a tentar ter um melhor panorama dos efeitos sobre os resultados.

Tabela 8: Análise de efeitos principais sobre os resultados da TE (N=2.450)

| Efeitos             | Significância (P) |               |                   |               |                   |                   |
|---------------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|-------------------|
|                     | P30               | P60           | Parto             | PEP           | Aborto            | Total             |
| Mês                 | <b>0,0284</b>     | <b>0,0043</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,4394        | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> |
| Fazenda             | <b>0,0084</b>     | <b>0,0662</b> | 0,1815            | 0,1130        | 0,3772            | <b>0,0470</b>     |
| Ordem inovulação    | 0,5348            | 0,1192        | <b>0,0121</b>     | 0,5005        | <b>0,0289</b>     | 0,6104            |
| Raça                | 0,8954            | 0,9343        | 0,5167            | 0,7089        | 0,4552            | 0,6017            |
| Paridade            | 0,1933            | 0,8140        | 0,6366            | <b>0,0181</b> | 0,1812            | <b>0,0014</b>     |
| ECC                 | 0,3098            | 0,6678        | 0,7654            | 0,0332        | 0,8450            | 0,4614            |
| Touro               | 0,9779            | 0,9158        | 0,8986            | 0,9756        | 0,7950            | 0,8998            |
| Estágio embrião     | <b>0,0001</b>     | <b>0,0009</b> | 0,0694            | 0,5688        | <b>0,0392</b>     | <b>0,0083</b>     |
| Dia                 | <b>0,0060</b>     | <b>0,0199</b> | <b>0,0490</b>     | 0,4917        | 0,5288            | 0,2917            |
| Ovário com CL       | 0,1889            | 0,1707        | 0,2017            | 0,9042        | 0,6667            | 0,7500            |
| Classificação do CL | 0,1958            | 0,1405        | 0,4364            | 0,2643        | 0,2286            | 0,6307            |
| Técnico             | 0,0649            | 0,1601        | 0,2419            | 0,3104        | 0,4155            | 0,2001            |

Avaliando o efeito de cada mês da estação de monta nos resultados se observa uma tendência no aumento das taxas de gestação a medida que a estação de monta progride, embora não exista diferença entre os meses para prenhez aos 30 e 60 dias (Tabela 9). O terceiro mês da estação foi o que apresentou os menores índices de perda gestacional, refletindo na taxa de parto. Enquanto os dois primeiros meses apresentaram as menores taxas de parto ou seja, alto índice de perdas gestacionais. De forma similar,

o primeiro mês da estação de monta apresentou a maior taxa de aborto, seguido do segundo mês que teve resultado igual ao quarto mês. Do outro lado, o terceiro e o quinto mês foram os que apresentaram as menores taxa de aborto. A taxa total de perdas gestacionais foi maior nos animais que receberam embrião no primeiro mês, e se apresentou menor no terceiro, quarto e quinto mês da estação de monta, voltando a subir no sexto e último mês da estação.

Tabela 9: Efeito do mês da estação de monta nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Mês da estação | N   | P30    | P60    | Parto             | PEP    | Aborto            | Total             |
|----------------|-----|--------|--------|-------------------|--------|-------------------|-------------------|
| Outubro        | 350 | 34,9   | 28,3   | 6,9 d             | 6,6    | 21,4 a            | 28,0 a            |
| Novembro       | 172 | 37,8   | 31,4   | 16,9 c            | 6,4    | 14,5 ab           | 20,9 ab           |
| Dezembro       | 415 | 39,8   | 33,0   | 28,0 a            | 6,8    | 5,1 d             | 11,8 cd           |
| Janeiro        | 506 | 41,1   | 36,2   | 26,9 ab           | 4,9    | 9,3 bc            | 14,2 cd           |
| Fevereiro      | 585 | 37,1   | 30,1   | 25,5 ab           | 7,0    | 4,6 d             | 11,6 d            |
| Março          | 422 | 37,7   | 30,6   | 21,6 bc           | 7,1    | 9,0 c             | 16,1 bc           |
| Valor de P     |     | 0,5128 | 0,1661 | <b>&lt;0,0001</b> | 0,7634 | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> |

A figura 12 demonstra que as taxas de prenhez aos 30 dias varia pouco durante os meses da estação assim como as perdas embrionárias preCCOes, consideradas até os 30 dias. Entretanto, as taxas de nascimentos e de perdas totais variam em função dos meses da estação de monta. Os dois parâmetros têm comportamentos inversos. Enquanto a taxa de parto dos primeiros animais trabalhados na estação é baixa e aumenta a medida que a estação progride, ocorrendo uma queda ao final da estação, a taxa total de perda se inicia alta e reduz em função dos meses de serviço, voltando a aumentar no final da estação de monta.

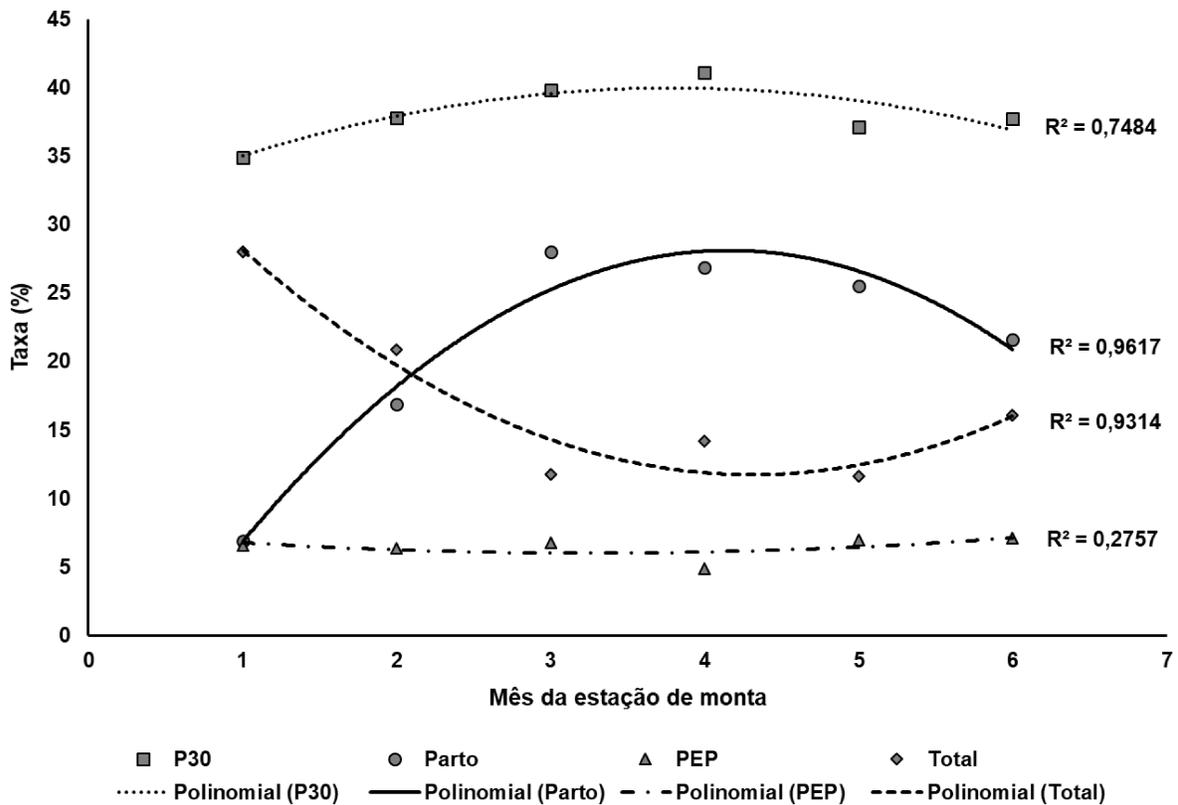


Figura 12: Taxa de gestação aos 30 dias (P30), taxa de gestação que foram a termo (Parto), percentual de perdas embrionárias até os 30 dias (PEP) e perdas totais (Total) ao longo da estação de transferência

A ineficiência reprodutiva é um dos fatores limitantes nos sistemas de produção em gado de corte, principalmente em sistema de cria. O planejamento e gerenciamento da estação reprodutiva de forma a maximizar o sucesso reprodutivo é extremamente importante para a atividade, buscando aumentar as taxas de gestação e reduzir as perdas gestacionais ao longo dos meses (Larson, White e Laflin, 2016). É considerado como falha reprodutiva quando se assume que os animais não emprenharam durante a estação reprodutiva ou ficam gestante, mas não mantêm a gestação até o parto (Lamb, 2013). Sendo a mortalidade embrionária uma das principais causas de perda econômica nos sistemas de produção em bovinocultura. Essas perdas refletem diretamente em taxas reduzidas de concepção, com consequentes efeitos para a eficiência da produção e na lucratividade (Diskin *et al.*, 2016). Embora a perda tardia de gestação, considerada após os 60 dias, seja numericamente menor do que as perdas embrionárias preCCOes, ela

causa perdas econômicas consideráveis, pois normalmente são detectadas ao término da estação de nascimento, tornando difícil identificar o momento das perdas (Diskin *et al.*, 2016). Por outro lado, as perdas embrionárias preCCOe detectadas até o segundo mês de gestação, permite ressincronizar os animais vazios e transferir novamente embriões. Diversos fatores pode influenciar nessas perdas, como endogamia, níveis de progesterona, idade materna, nutrição, balanço energético negativo, período pós parto, doenças infecciosas, estresse calórico entre outros (Diskin *et al.*, 2016; Hansen e Aréchiga, 1999).

O clima de Alta Floresta-MT é tropical, sendo os meses de maio a agosto os mais secos, enquanto de setembro a abril há maior pluviosidade, porém a temperatura durante todo o ano permanece elevada (climate-data.org., 2019). Além do já conhecido efeito do estresse térmico nas taxas de gestação e nas taxas de perdas (Santos *et al.*, 2014), deve-se levar em consideração que a estação de monta se iniciou no mês de outubro, logo no início da estação chuvosa. Os animais não receberam nenhum tipo de suplementação no período de seca e estavam na estação de parição. Consequentemente poderiam estar em balanço energético negativo levando em consideração uma dieta baseada somente em pastagem, na estação seca, e a grande maioria dos animais em lactação, uma vez estavam com bezerro ao pé. Além disso, pode existir uma influência da ordem de paridade dos animais referente a estação de monta anterior que tenha influenciado nos resultados de gestação. Os primeiros animais que receberam embrião podem ter tido um período pós-parto curto e consequentemente influência nas taxas de gestação e perdas gestacionais. Embora seja mais comum em animais com alta produção de leite, já foi demonstrado uma associação entre balanço energético durante as 3-4 primeiras semanas de lactação e o momento da primeira ovulação pós parto (Patton *et al.*, 2007). E sabe-se que que a taxa de concepção aumenta à medida que o intervalo pós-parto se torna mais longo (Grimard *et al.*, 2006). Além disso, no estudo Peixoto *et al.* (2006) foi demonstrado efeito do ano e também da estação do ano em que foi feito a transferência nas taxas de gestação. As perdas totais obtidas nesse trabalho foi similar a encontrado por outros grupos (Grimard *et al.*, 2006; Humblot, 2001; Santos *et al.*, 2004; Scanavez, Campos e Santos, 2013; Sreenan, Diskin e Morris, 2001).

Embora as perdas gestacionais observadas ao longo dos meses da estação de

monta possam ter sido influenciadas pelo balanço energético negativo e período pós-parto, não foi observado efeito do escore de condição corporal (ECC) em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 10). O ECC normalmente é uma avaliação que se faz nos animais para ter referência da condição corporal e consequentemente se o animal está apto a receber embrião ou ser inseminado e manter a gestação. O fato de não ter tido diferença entre os diferentes escores, não significa que essa avaliação não seja útil em rotinas de campo. No presente trabalho, não foi essa variável a responsável por explicar a variação encontrada nos parâmetros analisados. Embora já existam relatos na literatura demonstrando a relação entre ECC e taxa de gestação (Buckley *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 1999; Pryce, Coffey e Simm, 2001), principalmente quando animais gestantes perdem ECC, refletindo no aumento da perda gestacional (Silke *et al.*, 2002). No presente estudo, foi registrado o ECC dos animais somente no dia da TE.

Tabela 10: Efeito do Escore de condição corporal (ECC), avaliado no dia da transferência do embrião, nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Escore     | N   | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2,0 ou -   | 130 | 43,1   | 37,7   | 29,2   | 5,4    | 8,5    | 13,9   |
| 2,5        | 775 | 38,6   | 31,6   | 23,7   | 7,0    | 7,9    | 14,8   |
| 3,0        | 754 | 39,7   | 33,3   | 22,9   | 6,4    | 10,3   | 16,7   |
| 3,5        | 417 | 36,1   | 29,3   | 18,2   | 7,0    | 11,0   | 18,0   |
| 4,0        | 294 | 33,0   | 29,3   | 19,4   | 3,7    | 9,9    | 13,6   |
| 4,5 ou +   | 68  | 41,2   | 29,4   | 19,1   | 11,8   | 10,3   | 22,1   |
| Valor de P |     | 0,2724 | 0,3960 | 0,0607 | 0,1834 | 0,4925 | 0,3207 |

Com relação às categorias de paridade não se observou diferenças nas taxas de gestação aos 30 dias e nem aos 60 dias, assim como não houve diferenças na taxa de parto e nas taxas de aborto (Tabela 11). Porém, para as perdas embrionárias preCCOes as novilhas tiveram maior taxa observada comparada as demais categorias (Primípara, Pluripara e não lactante). Já para as perdas totais, os animais solteiros tiveram resultado similares novilhas, com as maiores taxas comparados as vacas primíparas e pluriparas. Embora não tenha se observado diferenças nas taxas de aborto entre as categorias e somente as novilhas tenha tido taxa maior de PEP, considerando as perdas totais os animais solteiros mais as novilhas tiveram maiores taxas com relação as demais categorias.

Os animais solteiros utilizados na estação de monta foram animais que por alguma razão não ficaram gestante da estação de monta anterior. Possíveis razões seriam algum problema reprodutivo que os impediram de alcançar uma gestação a termo, ou ficaram gestantes na estação de monta anterior e tiveram um aborto não identificado após o diagnóstico de gestação com 60 dias e iniciaram a estação de monta não lactantes. Essa última causa talvez ajude a justificar o motivo de terem tido uma taxa de aborto alta em relação as vacas primíparas e pluríparas. Pode ser animais reincidentes em aborto e diante da não identificação dessa característica não se retira esses animais do rebanho. Já para as novilhas, embora a taxa de gestação tenha sido igual, considerando somente os números, pode se observar até uma tendência a ser superior as demais categorias em P30. Porém os animais não foram capazes de manter a gestação e tivera uma PEP alta, que teve reflexo nas perdas totais registradas para essa categoria. Resultados similares foram observados, no qual a ordem de paridade influenciou as taxas de gestação (Mikkola, Andersson e Taponen, 2015).

Já se sabe que um dos fatores limitantes do desempenho reprodutivo é o fato dos produtores não terem á disposição o número necessário de novilhas para compensar as perdas ou descartes de animais mais velhos ou com problemas reprodutivos do rebanho (Otava, 2010). E além disso, taxas mais altas de fertilidade e preCCOidade sexual resultam em um maior número de animais nos rebanhos e conseqüentemente em maior produção (Terakado *et al.*, 2014). Alguns estudos buscam alternativas de aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos de corte (Correa-Calderón *et al.*, 2019; Kasimanickam *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2017; Terakado *et al.*, 2014), no entanto diversos fatores influenciam nesse aumento de eficiência.

Tabela 11: Efeito da ordem de paridade nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Categoria    | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP           | Aborto | Total         |
|--------------|------|--------|--------|--------|---------------|--------|---------------|
| Novilha      | 19   | 52,6   | 26,3   | 10,5   | 26,3 a        | 15,8   | 42,1 a        |
| Primípara    | 2308 | 37,9   | 31,5   | 22,4   | 6,4 b         | 9,1    | 15,5 b        |
| Plurípara    | 37   | 40,5   | 40,5   | 29,7   | 0,0 b         | 10,8   | 10,8 b        |
| Não lactante | 86   | 43,0   | 36,1   | 18,6   | 7,0 b         | 17,4   | 24,4 a        |
| Valor de P   |      | 0,4373 | 0,4978 | 0,3363 | <b>0,0018</b> | 0,0552 | <b>0,0015</b> |

Levando em consideração as receptoras classificadas como cruzadas e zebuínas, não houve diferença em nenhum parâmetro analisado entre elas (Tabela 12). Embora o  $n$  de animais cruzados como receptora tenha sido pequeno, o grupamento racial considerado de forma isolada não explica as variações de resultados e as perdas de gestação. Diversos outros fatores, tais como, ambiente uterino, concentração de progesterona, estresse térmico, doenças, estado nutricional, estado fisiológico entre outros, influenciam de maneira mais efetiva o sucesso reprodutivo e as perdas gestacionais (Santos *et al.*, 2004). Resultados semelhantes de gestação e perdas gestacionais foram descritas por Sartori *et al.*, (2016) utilizando como receptoras, animais de corte e cruzados.

Tabela 12: Efeito do grupamento racial das receptoras de embrião utilizadas nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Subgrupo   | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Cruzado    | 79   | 38,0   | 32,9   | 17,7   | 5,1    | 15,2   | 20,3   |
| Zebuino    | 2008 | 38,3   | 31,6   | 21,5   | 6,6    | 10,11  | 16,7   |
| Valor de P |      | 0,9610 | 0,8093 | 0,4199 | 0,5828 | 0,1451 | 0,4125 |

Com relação ao lado que foi observado a presença do corpo lúteo e consequentemente depositado ao embrião, não houve diferença nos resultados (Tabela 13). Assim como não houve diferenças em função da classificação dos CL (Tabela 14). A classificação do CL em pequeno, médio ou grande ocorreu em função do tamanho. No entanto, o tamanho do CL assim como o lado que está presente, não pode ser considerado de forma isolada pelos resultados de taxa de gestação e perdas (Neto *et al.*, 2014). Já se sabe que os CL de maior tamanho tendem a produzir maior concentração de progesterona em relação aos de tamanho inferior, embora não interfira nas taxas de gestação. No entanto, a classificação dos CL em pequeno (pequeno) não significa que o tamanho no estroma ovariano também seja pequeno, enquanto o classificado em grande pode conter pouca massa lutea, o que implicaria em pouca produção de progesterona (Vieira *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2009). Além disso, para que a progesterona produzida nos CL seja adequadamente distribuída é necessário a presença de vascularização, o que não pode ser identificado pelo método da palpação retal (Siqueira *et al.*, 2019). Assim, possivelmente a presença do CL é mais importante do que o seu tamanho e o lado que

está presente. A presença do CL indica que o animal ovulou, embora não se saiba o dia exato da ovulação.

Tabela 13: Efeito do lado do ovário no qual havia a presença do corpo lúteo (CL) nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Ovário     | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Direito    | 1490 | 39,7   | 33,0   | 22,8   | 6,7    | 10,3   | 17,0   |
| Esquerdo   | 959  | 35,8   | 29,7   | 21,4   | 6,1    | 8,3    | 14,4   |
| Valor de P |      | 0,0501 | 0,0866 | 0,4242 | 0,5142 | 0,1128 | 0,0877 |

Tabela 14: Efeito da qualidade do corpo lúteo (CL) avaliado por palpação retal nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Classificação | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|---------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pequeno       | 118  | 29,7   | 22,9   | 18,6   | 6,8    | 4,2    | 11,0   |
| Médio         | 1060 | 39,9   | 33,1   | 22,9   | 6,8    | 10,2   | 17,0   |
| Grande        | 819  | 39,3   | 33,0   | 23,3   | 6,4    | 9,7    | 16,0   |
| Valor de P    |      | 0,0944 | 0,0727 | 0,5244 | 0,9264 | 0,1148 | 0,2426 |

Com relação a propriedade também não houve diferenças significativas entre as duas fazendas que participaram das transferências (Tabela 15). Sabe-se que os resultados podem variar entre fazendas, e que são necessários monitoramento e avaliação rigorosa para que essa biotécnica possa ser utilizada em grande escala. Sendo aplicada de forma criteriosa é possível aumentar a eficiência reprodutiva e lucratividade com embriões produzidos *in vitro* (Sartori *et al.*, 2016). No presente estudo, na primeira estação de monta com o uso de embriões foram selecionadas somente duas fazendas e buscou-se aplicar em ambas os mesmos critérios e com a mesma rigorosidade.

Tabela 15: Efeito da fazenda na qual foram transferidos os embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Fazenda           | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|-------------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Bandeirantes      | 889  | 35,9   | 30,4   | 20,9   | 5,5    | 9,5    | 15,0   |
| Bandeirantes VIII | 1561 | 39,5   | 32,5   | 23,0   | 7,0    | 9,6    | 16,5   |
| Valor de P        |      | 0,0744 | 0,2668 | 0,2349 | 0,1541 | 0,9377 | 0,3084 |

As TE foram realizadas por três técnicos distintos, no entanto, um técnico foi retirado das análises em função do pequeno *n* registrado. Não foi observado diferença

entre os dois técnicos entre os parâmetros analisados (Tabela 16). O procedimento de transferência de embriões deve ser feito sempre por um técnico habilitado e capacitado, e uma vez que os profissionais estejam devidamente treinados e executam os procedimentos da forma correta se espera que não exista diferenças entre os profissionais. A variação de resultados observadas são melhores explicadas por outras variáveis inerentes da técnica.

Tabela 16: Efeito do técnico que realizou a transferência dos embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Técnico    | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Técnico 1  | 2135 | 37,9   | 31,2   | 21,7   | 6,7    | 9,5    | 16,2   |
| Técnico 2  | 315  | 40,6   | 35,6   | 26,0   | 5,1    | 9,5    | 14,6   |
| Valor de P |      | 0,3415 | 0,1206 | 0,0834 | 0,2891 | 0,9930 | 0,4815 |

Outra variável considerada no presente estudo foi a ordem da transferência, considerando média de 25 embriões por hora de serviço, ou seja, a cada 25 embriões transferidos no dia se gastou uma hora (Tabela 17). O número de horas de serviço não teve efeito nas taxas de gestação (P30 e P60) e nem nas perdas embrionárias e gestacionais. Um dos limitantes para a implementação da transferência de embriões em tempo fixo (TETF) em grande escala em gado de corte é a quantidade de transferências realizadas em um único dia. Em função do cuidado que deve ser tomado para a realização do procedimento de TE, a quantidade possível de transferência em um único dia é inferior ao que se realiza de rotina nos trabalhos de inseminação em tempo fixo (IATF). No entanto, mesmo nos trabalhos em que um único técnico transferiu grande quantidade de embriões no dia não houve o comprometimento dos resultados. Resultados similares foram encontrados somente no trabalho de Scanavez et al., (2013).

Tabela 17: Efeito da ordem de transferência dos embriões nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Ordem     | N   | P30  | P60  | Parto | PEP | Aborto | Total |
|-----------|-----|------|------|-------|-----|--------|-------|
| 1 a 25    | 371 | 34,8 | 26,7 | 18,3  | 8,1 | 8,4    | 16,4  |
| 26 a 50   | 374 | 35,3 | 30,5 | 20,9  | 4,8 | 9,6    | 14,4  |
| 51 a 75   | 364 | 39,8 | 33,2 | 26,1  | 6,6 | 7,1    | 13,7  |
| 76 a 100  | 361 | 39,1 | 33,2 | 25,5  | 5,8 | 7,8    | 13,6  |
| 101 a 125 | 262 | 35,1 | 27,1 | 19,1  | 8,0 | 8,0    | 16,0  |

|            |     |        |        |        |        |        |        |
|------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 126 a 150  | 185 | 36,2   | 30,3   | 18,9   | 6,0    | 11,4   | 17,3   |
| 151 a 175  | 90  | 43,3   | 38,9   | 23,3   | 4,4    | 15,6   | 20,0   |
| >175       | 47  | 42,5   | 34,0   | 27,7   | 8,5    | 6,4    | 14,9   |
| Valor de P |     | 0,5728 | 0,2062 | 0,0823 | 0,5860 | 0,2293 | 0,7410 |

Das variáveis consideradas nas análises, a grande maioria foi mais diretamente relacionada ao campo. Entretanto, três variáveis apresentam uma relação mais direta com a parte laboratorial (touro, dia do embrião e estágio de desenvolvimento).

Foram utilizados dois touros distintos para a fertilização *in vitro*, ambos com sêmen sexado de macho. Não foi observado diferenças na taxa de gestação entre os touros, porém, a taxa de aborto foi diferente, o que teve reflexo na taxa de parto (Tabela 18). O touro que apresentou maior taxa de aborto foi o mesmo que apresentou menor taxa de parto. Na inseminação artificial já foi descrito diferenças entre touros nas taxas de gestação e abortos, enquanto para a PIVE é mais relatado diferença na produção de blastocistos entre touros do que efeito do touro nas taxas de gestação e perdas gestacionais (Morotti *et al.*, 2014). No entanto, em um estudo com embriões produzidos *in vivo* foi observado maior mortalidade de bezerros machos quando foi utilizado sêmen sexado comparado a convencional (Mikkola, Andersson e Taponen, 2015). Na literatura observa-se estudos uma maior quantidade de diferentes touros e esses apresentaram resultados similares, porém divergentes dos dados apresentados no presente trabalho, no qual não foi encontrado nenhum efeito de touro nas taxas de gestação e perdas (Morotti *et al.*, 2014; Scanavez *et al.*, 2013). Essas taxas, entre outras, podem ser influenciados por anormalidades cromossômicas, que pode ter efeito da doadora e/ou do touro, e nesse sentido os diferentes touros podem influenciar nos resultados após a transferência.

Tabela 18: Efeito do touro utilizado para fertilização *in vitro* nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Touro      | N    | P30    | P60    | Parto         | PEP    | Aborto        | Total  |
|------------|------|--------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| Final      | 1944 | 38,6   | 32,1   | 23,2          | 6,5    | 8,9           | 15,4   |
| Safe       | 506  | 36,8   | 30,6   | 18,6          | 6,1    | 12,1          | 18,2   |
| Valor de P |      | 0,4526 | 0,5425 | <b>0,0259</b> | 0,7402 | <b>0,0285</b> | 0,1254 |

Na avaliação referente ao dia de desenvolvimento do embrião transferido, não

foi encontrado diferenças com relação aos parâmetros de taxa de gestação e perda gestacional (Tabela 19). Durante o tempo de cultivo ocorre uma assincronia de desenvolvimento entre os embriões, os quais podem atingir o estágio de blastocisto, no sexto dia, sétimo dia ou mesmo no oitavo dia. O dia esperado para que os embriões alcancem esse estágio é o sétimo dia, sendo o sexto dia os embriões mais adiantados e os que chegam a blastocisto somente no oitavo dia, considerados tardios (Gardner e Kelley, 2017). Alguns estudos demonstraram resultados diferentes dos encontrados no presente trabalho, nos quais foram observados efeito do tempo de cultivo do embrião nas taxas de gestação (Scanavez *et al.*, 2013). A diferença do *n* entre os 3 dias (D6, D7, D8) pode ter influenciado para que não fosse encontrado alterações nos resultados em nosso estudo. No entanto, considerando que o estágio de desenvolvimento fosse o mesmo (Bi, Bl, Bx ou Be) ainda que o tempo de cultivo fosse diferente, os embriões poderiam ter potencial de gestação similar e conseqüentemente não influenciar nas taxas de gestação. Isso porque, apesar do cultivo exercer efeito sobre o metabolismo do embrião podendo levar a uma alteração da sua qualidade (Rizos *et al.*, 2003), embriões em estágios de desenvolvimento iguais tende a apresentar um padrão metabólico e bioquímico similar (Hasler, 2003). Dessa maneira o efeito nas taxas de gestações e perdas embrionárias pode ser muito mais relacionado ao estágio de desenvolvimento do que o tempo no cultivo. Sendo que a sincronia do embrião com a receptora é outro parâmetro que influencia as taxas de gestação conforme demonstrou Neto e colaboradores (2014).

Tabela 19: Dia do desenvolvimento do embrião Efeito do tempo de cultivo (dias do embrião em desenvolvimento no cultivo) nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Tempo de cultivo (dias) | N    | P30    | P60    | Parto  | PEP    | Aborto | Total  |
|-------------------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 6                       | 36   | 47,2   | 44,4   | 30,6   | 2,8    | 13,9   | 16,7   |
| 7                       | 2279 | 38,4   | 31,8   | 22,2   | 6,6    | 9,6    | 16,2   |
| 8                       | 135  | 32,6   | 28,2   | 20,7   | 4,4    | 7,4    | 11,9   |
| Valor de P              |      | 0,2149 | 0,1750 | 0,4456 | 0,4023 | 0,4715 | 0,4059 |

Com relação ao efeito do estágio de desenvolvimento embrionário, foi observado diferenças nas taxas de gestação aos 30 e 60 dias e nas taxas de aborto e perdas totais entre as diferentes fases de desenvolvimento (Tabela 20). O estágio que

apresentou a maior taxa de gestação aos 30 e 60 dias foi o Bx. Enquanto as menores taxas de aborto observado fora, para Bi e Bl e de perda de gestação total foi somente o Bi (Tabela 20).

Na literatura se encontra trabalhos no qual a fase de desenvolvimento embrionário não alterou as taxas de gestação (Scanavez *et al.*, 2013) e trabalhos que mostram resultados similares aos encontrados nesse estudo (Neto *et al.*, 2014). Esses resultados divergente podem ser explicados pela influência de outros parâmetros que eventualmente foram desconsiderados da análise, tais como sincronia da receptora com o embrião, touro, época de transferência, dieta das receptoras, fonte dos oócitos, condições ambientais e de manejo dentre outras. Diferentemente de outros trabalhos, os resultados apresentados aqui foram de cada estágio de desenvolvimento individual e não houve agrupamento entre os diferentes estágios embrionários. Nas rotinas comerciais a preferência é sempre por transferir embriões em fase de Bx, porém como existe um desenvolvimento assincrônico, quando a quantidade de Bx produzido não é suficiente para a quantidade de receptoras preparadas outros estágios são transferidos. Já foi relatado que embriões em estágios muito precoces ou muito tardios contribuem para redução das taxas de gestação, que pode ser em função de alteração de metabolismo, evidenciado pela cinética. Se considerarmos que todos eles tem o mesmo tempo de cultivo, ou mesmo em função da assincronia com a receptora (Peixoto *et al.*, 2007). Nessa situação, se o embrião não tiver produção adequada de interferon *tau* não irá ocorrer o reconhecimento materno da gestação (Binelli *et al.*, 2001; Neto *et al.*, 2014). Mas, os estágios mais precoces, principalmente os Bi, quando conseguem alcançar uma gestação a termo apresentam menores taxas de aborto e perdas gestacionais total.

Na produção *in vivo* de embriões as taxas de gestação são maiores quando se transfere embriões mais iniciais (Bó *et al.*, 2012; Hanekamp, 1999; Peixoto *et al.*, 2007), diferentemente do observado em embriões produzidos *in vitro*. Porém, em um estudo mais recente, foi observado taxas de gestação inferiores com embriões mais iniciais, tais como mórula compacta (Mikkola, Andersson e Taponen, 2015). No entanto, apesar de taxas mais baixas de gestação observadas com embriões iniciais, esses embriões tiveram menores taxas de aborto e perdas totais. Considerando que os embriões produzidos *in vivo* é o padrão da espécie, quando os estágios mais iniciais

conseguem chegar a uma gestação a termo, apresentam menores problemas e consequentemente menores perdas gestacionais, mesmo sendo produzidos *in vitro*. Os embriões, *in vivo* e *in vitro*, apresentam desenvolvimento similar até o estágio de oito células, e a partir dessa fase o desenvolvimento dos embriões *in vitro* é alterado (Fontanier-Razzaq *et al.*, 2001; Thompson, 2000). E parte disso é refletido em função de embriões *in vitro* apresentam mecanismo de reconhecimento materno da gestação mais tardiamente, sabendo que *in vivo* a partir do sétimo dia de desenvolvimento o embrião já é capaz de modular a composição bioquímica uterina (Sponchiado *et al.*, 2019). Por essa razão se utiliza preferencialmente embriões em estágios de blastocisto mais avançado, tais como Bx (Feres *et al.*, 2018).

Tabela 20: Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião selecionado para transferência nas taxas de gestação e perdas gestacionais [%]

| Estágio    | N    | P30           | P60           | Parto  | PEP    | Aborto        | Total         |
|------------|------|---------------|---------------|--------|--------|---------------|---------------|
| Bi         | 97   | 32,0 b        | 28,9 ab       | 24,7   | 3,1    | 4,1 b         | 7,2 b         |
| Bl         | 490  | 34,1 b        | 27,4 b        | 20,8   | 6,7    | 6,5 b         | 13,3 a        |
| Bx         | 1805 | 39,9 a        | 33,4 a        | 22,8   | 6,5    | 10,6 a        | 17,1 a        |
| Be         | 58   | 29,3 b        | 22,4 b        | 12,1   | 6,9    | 10,3 ab       | 17,2 a        |
| Valor de P |      | <b>0,0245</b> | <b>0,0247</b> | 0,1909 | 0,5892 | <b>0,0130</b> | <b>0,0181</b> |

De maneira geral, os resultados da PIVE, desde a recuperação dos oócitos nas doadoras até o nascimento dos animais são extramamente sensíveis a diversos fatores. Se considerarmos de maneira mais ampla, a forma como a doadora de oócitos é mantida até o animal produzido por fertilização *in vitro* após o nascimento, mais variáveis surgem no processo. Além de todos os fatores descritos ao longo do trabalho, há ainda variações epigenéticas que podem estar envolvidos no comprometimento dos embriões, das gestações e até mesmo dos animais nascido resultantes (Mikkola, Andersson e Taponen, 2015), e que muitas vezes são desconsideradas ou mesmo desconhecidas. Por essa razão, além da importância econômica, o uso da PIVE na espécie bovina permite uma perspectiva interessante, pois cada etapa pode ser realizada e avaliada de forma separada. Isso permite aprofundar no conhecimento dos possíveis efeitos epigenéticos e entender diversos fatores, desde os efeitos de manipulação do estro no oócito até efeitos das condições de cultivo, ambiente uterino dentre outros (Sirard, 2017). A análise de dados comerciais, além de permitir entender a realidade de uso da técnica, possibilita o

estudo com tamanho de amostras inviáveis do ponto de vista experimental, tanto prática quanto financeiramente. No entanto, com o entendimento da aplicação podem surgir perguntas que somente em experimentos devidamente delineados serão possíveis testar hipóteses. Dessa forma, atividade comercial e experimental devem caminhar em paralelo quando os objetivos são em comum.

## 5. CONCLUSÃO

- Uso de sêmen selecionado para macho tem resultados satisfatórios, mas ainda são necessários ajustes;
- PIVE possibilita ajustes nos protocolos, tanto técnico quanto financeiro;
- As taxas de gestação e perdas gestacionais são mais afetadas por variáveis extramuros ao laboratório, ligada diretamente ao campo.
- Gado de corte comercial é um potencial nicho de mercado;

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma biotécnica da reprodução com diversas vantagens para a bovinocultura, mas com muitas variáveis que influenciam os resultados. Trabalhos científicos permitiram um avanço considerável na eficiência do processo e o desenvolvimento de outras técnicas. Entretanto, a aplicação destes avanços tecnológicos na maioria das vezes gera mais perguntas do que respostas, e juntamente novos desafios surgem.

A maioria dos estudos relacionados a produção *in vitro* de embriões busca respostas para as variáveis e fatores diretamente envolvidos nos procedimentos laboratoriais. Pouca atenção tem se dado as variáveis externas ao laboratório nas questões ligadas aos índices de gestação, perdas gestacionais e nascimento de animais produzidos a partir dessa biotécnica. Para isso, é importante compreender o processo como um todo, desde a coleta dos oócitos até o acompanhamento produtivo desses animais.

Os trabalhos experimentais comumente avaliam fatores isolados da PIVE e que muitas vezes tem comportamento diferente quando analisados em interação com os

demais parâmetros ligados a técnica. Dessa forma, é importante também conhecer e compreender os fatores ligados as variações de resultados observados e as limitações existentes de uma rotina comercial de forma a identificá-los de maneira mais efetiva, e buscar soluções através de trabalhos experimentais.

Nesse estudo foi possível compreender o importante papel da doadora nos resultados da PIVE, assim como a possibilidade de alcançar diferentes resultados em função de alterações de protocolos laboratoriais. Adicionalmente, os fatores ligados ao campo, como qualidade dos oócitos recuperados até fatores relacionados a receptora de embrião, são extremamente importantes nos índices de gestação, perdas gestacionais e nascimento. Os resultados abrem possibilidades de estudo desses fatores para melhorar tais índices, uma vez que os laboratórios são apenas parte dos resultados, e que as variáveis observadas no campo têm papel fundamental, embora pouco considerado pela grande maioria dos profissionais envolvidos nas rotinas de OPU-PIVE.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 2014. **Estatísticas: balanço da pecuária**. São Paulo, SP: ABIEC. pp. 19.

ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 918–926, 2005.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177–188, 1992.

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.

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1–2, p. 48–61, 2008.

ARNAUD, P. Genomic imprinting in germ cells: Imprints are under control. **Reproduction**, v. 140, n. 3, p. 411–423, 2010.

AUWERA, I. VAN DER; D’HOOGHE, T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 6, p. 1237–1243, 2001.

BALABAN, B.; URMAN, B.; SERTAC, A.; ALATAS, C.; AKSOY, S.; MERCAN, R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, n. 12, p. 3431–3433, 1998.

BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; GIMENES, L. U. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: Effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 264–272, 2016.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31 (2): 205–211.

BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. H.; SALES, J. N.; SARTORI, R. Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 263–269, 2016.

BAYEUX, B. M.; CARVALHO, L. M.; WATANABE, Y. F.; MINGOTI, R. D.; OLIVEIRA, A. S.; CHIBA, M. O.; AZRAK, A. J.; CASTRO, P. M. N.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of animal category (prepubertal, pubertal and pregnant) on in vitro embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 488–488, 2016.

BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H.; CARGILL, S. L.; KREUSCHER, B. R.; MEDRANO, J. F.; MURRAY, J. D. August 17, 1994 December 30, 1994. **Theriogenology**, v. 44, n. 95, p. 227–232, 1994.

BENDER, R. W.; HACKBART, K. S.; DRESCH, A. R.; CARVALHO, P. D.; VIEIRA, L. M.; CRUMP, P. M.; GUENTHER, J. N.; FRICKE, P. M.; SHAVER, R. D.; COMBS, D. K.; WILTBANK, M. C. Effects of acute feed restriction combined with

targeted use of increasing luteinizing hormone content of follicle-stimulating hormone preparations on ovarian superstimulation, fertilization, and embryo quality in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 764–778, 2014.

BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; BEAM, S. W.; CARNEIRO, G. F.; SWEEN, M. L.; KOMINEK, D. J.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973–994, 2002.

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

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**, v. 16, p. 6–21, 2002.

BLONDIN, P. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 32–36, 2017.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. Oocyte and Follicular Morphology as Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 54–62, 1995.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. -A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54–62, 1995.

BÓ, G. A.; PERES, L. C.; CUTAIA, L. E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 272–277, 2012.

BOURC'HIS, D.; XU, G. L.; LIN, C. S.; BOLLMAN, B.; BESTOR, T. H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, n. 5551, p. 2536–2539, 2001.

BUCKLEY, F.; O'SULLIVAN, K.; MEE, J. F.; EVANS, R. D.; DILLON, P. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2308–2319, 2003.

CALLE, A.; MIRANDA, A.; FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; PERICUESTA, E.; LAGUNA, R.; GUTIERREZ-ADAN, A. Male Mice Produced by In Vitro Culture Have Reduced Fertility and Transmit Organomegaly and Glucose Intolerance to Their Male Offspring. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 2, p. 1–9, 2012.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A.

A.; FILHO, V. R. V. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2006.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VALE FILHO, V. R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1–2, p. 53–59, 2005.

CANTONE, I.; FISHER, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 282–289, 2013.

CARVALHO, P. D.; SOUZA, A. H.; AMUNDSON, M. C.; HACKBART, K. S.; FUENZALIDA, M. J.; HERLIHY, M. M. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 3666–3683, 2014.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Programming of DNA Methylation Patterns. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 97–117, 2012.

CEELEN, M.; WEISSENBRUCH, M. M. VAN; VERMEIDEN, J. P. W.; LEEUWEN, F. E. VAN; WAAL, H. A. D. DE. Vitro Fertilization: Follow-Up Study. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolic**, v. 93, n. April, p. 1682–1688, 2008.

CHAKARIDA, M.; MASI, S.; LUSCHER, T. F.; KASTELEIN, J. J. P.; DEANFIELD, J. E. Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation. **European Heart Journal**, v. 31, p. 2854–2861, 2010.

CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S.; SIRARD, M. A.; SULLIVAN, R.; BAILEY, J. L. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 55, p. 823–835, 2001.

CHAUBE, S. K.; PRASAD, P. V.; THAKUR, S. C.; SHRIVASTAV, T. G. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 863–874, 2005.

CHAVES VIEIRA, R.; VILELA, R.; FRANCO, R.; GOMES DINIZ, E.; JACOMINI, J. O. Relação Entre a Morfologia Do Corpo Lúteo E Índices De Prenhez Em Receptoras De Embriões Bovinos Relationship Between the Corpus Luteum Morphology and Pregnancy Rates in Bovine Embryo Recipients. **Original Article Biosci J**, v. 18, n. 2, p. 99–102, 2002.

CHEN, M.; WU, L.; ZHAO, J.; WU, F.; DAVIES, M. J.; WITTERT, G. A. Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by in-vitro fertilization ( IVF ). **Clinical Trials**, p. 1–29, 2014.

CHOUFANI, S.; SHAPIRO, J. S.; SUSIARJO, M.; BUTCHER, D. T.;

GRAFODATSKAYA, D.; LOU, Y.; FERREIRA, J. C.; PINTO, D.; SCHERER, S. W.; SHAFFER, L. G.; COULLIN, P.; CANIGGIA, I.; BEYENE, J.; SLIM, R.; BARTOLOMEI, M. S.; WEKSBERG, R. A novel approach identifies new differentially methylated regions ( DMRs ) associated with imprinted genes. **Genome Research**, v.21, p.465–476, 2011.

CHOUFANI, S.; SHUMAN, C.; WEKSBERG, R. Beckwith – Wiedemann Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v.354, p.343–354, 2010.

CLIMATE, 2019 - <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/mato-grosso/alta-floresta-4078/>. Acessado em 15/10/2019.

CORREA-CALDERÓN, A.; ANGULO-VALENZUELA, I.; BETANCOURTH, F.; OROZ-ROJO, F.; FIERROS-CASTRO, K.; MACÍAS-CRUZ, U.; DÍAZ-MOLINA, R.; AVENDAÑO-REYES, L. Conception rate following artificial insemination with sexed semen in Holstein heifers under artificial cooling during summer compared with winter season. **Tropical Animal Health and Production**, n. Fierros 2015, 2019.

CORRY, G. N.; TANASIJEVIC, B.; BARRY, E. R.; KRUEGER, W.; RASMUSSEN, T. P. Epigenetic Regulatory Mechanisms During Preimplantation Development. **Birth Defects Research**, v. 313, n. Part C, p. 297–313, 2009.

CRISPI, F.; BIJNENS, B.; FIGUERAS, F.; BARTRONS, J.; EIXARCH, E.; NOBLE, F. LE; AHMED, A.; GRATACÓS, E. Fetal Growth Restriction Results in Remodeled and Less Efficient Hearts in Children. **Pediatric Cardiology**, v. 121, p. 2427–2436, 2015.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 93–100, 2003.

DEMYDA-PEYRÁS, S.; DORADO, J.; HIDALGO, M.; MORENO-MILLÁN, M. Influence of sperm fertilising concentration, sperm selection method and sperm capacitation procedure on the incidence of numerical chromosomal abnormalities in IVF early bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 2, p. 351–359, 2015.

DENOMME, M. M.; ZHANG, L.; MANN, M. R. W. Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 3, p. 734- 738.e2, 2011.

DISKIN, M. G.; WATERS, S. M.; PARR, M. H.; KENNY, D. A. Pregnancy losses in cattle: Potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1–2, p. 83–93, 2016.

DJEBALI, S.; DAVIS, C. A.; MERKEL, A.; DOBIN, A.; LASSMANN, T.; MORTAZAVI, A.; TANZER, A.; LAGARDE, J.; LIN, W.; SCHLESINGER, F.; XUE,

C.; MARINOV, G. K.; KHATUN, J.; WILLIAMS, B. A.; KOKOCINSKI, F.; ABDELHAMID, R. F.; ALIOTO, T.; ANTOSHECHKIN, I.; GONZALEZ, D.; GORDON, A.; GUNAWARDENA, H.; HOWALD, C.; JHA, S.; JOHNSON, R.; KAPRANOV, P.; RISK, B.; ROBYR, D.; SAMMETH, M.; SCHAFFER, L.; SEE, L.; SHAHAB, A.; SKANCKE, J. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v.489, p.2–9, 2012.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 1–2, p. 15–23, 2002.

DONJACOUR, A.; LIU, X.; LIN, W.; SIMBULAN, R.; RINAUDO, P. F. In Vitro Fertilization Affects Growth and Glucose Metabolism in a Sex-Specific Manner in an Outbred Mouse Model. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 1–10, 2014.

DOORNBOS, M. E.; MAAS, S. M.; MCDONNELL, J.; VERMEIDEN, J. P. W.; HENNEKAM, R. C. M. Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: A Dutch study. **Human Reproduction**, v. 22, n. 9, p. 2476–2480, 2007.

EBBESSEN, S. M. S.; ZACHARIAE, R.; MEHLSSEN, M. Y.; THOMSEN, D.; HØJGAARD, A.; OTTOSEN, L.; PETERSEN, T.; INGERSLEV, H. J. Stressful life events are associated with a poor in-vitro fertilization (IVF) outcome: A prospective study. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2173–2182, 2009.

EBNER, T.; YAMAN, C.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M.; FEICHTINGER, O.; TEWS, G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 427–430, 2000.

EGGERMANN, T.; GONZALEZ, D.; SPENGLER, S.; ARSLAN-KIRCHNER, M.; BINDER, G.; SCHÖNHERR, N. Broad clinical spectrum in Silver-Russell syndrome and consequences for genetic testing in growth retardation. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. 1–5, 2009.

EMBRAPA.<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0290b.php>. Acessado em: 17/09/2017.

EROGLU, A.; LAYMAN, L. C. Role of ATP in imprinting disorders. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 2, p. 1–26, 2012.

ERTZEID, G.; STORENG, R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 2, p. 221–225, 2001.

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, C. L.; ZWAAG, D. F. VANDER; FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 125–138, 2003.

FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R.; MARTINS, G. A.; OLIVEIRA, S. M. P. DE; AZEVÊDO, D. M. M. R. Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holandês x Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 1, p. 48–53, 2008.

FADDY, M. J.; GOSDEN, R. G.; GOUGEON, A.; RICHARDSON, S. J.; NELSON, J. F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1342–1346, 1992.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, n. 4, p. 327–336, 1997.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 00, p. 151–170, 2001.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of Bovine Embryos Produced In Vivo or In Vitro : Survival and Fetal Development '. **Biology of Reproduction**, v. 682, p. 676–682, 1995.

FAUQUE, P.; JOUANNET, P.; LESAFFRE, C.; RIPOCHE, M. A.; DANDOLO, L.; VAIMAN, D.; JAMMES, H. Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 19, 2007.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic Reprogramming in Plant. **Science**, v. 330, p. 622–627, 2010.

FERES, L. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; SANTOS, L. L. DOS; BRANDAO, F. Z.; VIANA, J. H. M. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies. **Animal Reproduction Science**, v. 193, p. 165–170, 2018.

FERREIRA, A. R.; FRANCO, M. M. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 3–9, 2012.

FLEMING, T. P.; SHETH, B.; FESENKO, I. Division of Cell Sciences, School of Biological Sciences, University of Southampton, Bassett Crescent East, Southampton SO16 7PX, UK. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 1000–1007, 2001.

FONTANIER-RAZZAQ, N.; G. MCEVOY, T.; ROBINSON, J. J.; REES, W. D. DNA Damaging Agents Increase gadd153 (CHOP-10) Messenger RNA Levels in Bovine Preimplantation Embryos Cultured In Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1386–1391, 2001.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows1. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 9–17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R.; LE, L.; KINGDOM, U. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows 1. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. March, p. 9–17, 2007.

GABRIELSEN, A.; LINDENBERG, S.; PETERSEN, K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. **Human Reproduction**, v. 16, n. 10, p. 2166–2170, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 138–151, 2014.

GARCIA, S. M.; SIM, L.; MARINHO, R.; LUNARDELLI, P. A. Developmental Block and Programmed Cell Death in *Bos indicus* Embryos: Effects of Protein Supplementation Source and Developmental Kinetics. **PLOS One**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

GARDNER, D. K.; KELLEY, R. L. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 4, p. 418–435, 2017.

GARDNER, K. E.; ALLIS, C. D.; STRAHL, B. D. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 1, p. 36–46, 2011.

GARNSWORTHY, P. C.; LOCK, A.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3814–3823, 2008a.

GARNSWORTHY, P. C.; LOCK, A.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 2. Dietary fatty acids and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3824–3833, 2008b.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; SÁ FILHO, M. F.; MEIRELLES, F. V.; TRINCA, L. A.; RENNÓ, F. P.; WATANABE, Y. F.; BARUSELLI, P. S. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 385–393, 2015.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Minireview Selection of the Dominant Follicle in Cattle. **Biology of reproduction**, v. 1194, p. 1187–1194, 1996.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: A mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatric Research**, v. 56, n. 3, p. 311–317, 2004.

GOLBABAPOUR, S.; ABDULLA, M. A.; HAJREZAEI, M. A Concise Review on Epigenetic Regulation: Insight into Molecular Mechanisms. **International Journal Molecular Science**, v. 12, p. 8661–8694, 2011.

GONG, J. G.; LEE, W. J.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 419–427, 2002.

GRÁZIA, J. G. V. **CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES EM RAÇAS LEITEIRAS TAURINAS E ZEBUÍNAS**. Dissertação de mestrado, [s.l: s.n.], 2014.

GRÁZIA, J. G. V.; SILVEIRA, R. O.; SANTOS, G. M.; GERAIS, F. D. M. Desempenho de doadoras leiteiras mestiças F1 (Gir X Holandês) no sistema de produção in vitro de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, p. 1–6, 2015.

GRIMARD, B.; FRERET, S.; CHEVALLIER, A.; PINTO, A.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1–2, p. 31–44, 2006.

GUERREIRO, B M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; VIEIRA, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; FREITAS, B. G.; BARUSELLI, P. S. Prepubertal Holstein heifers have low efficiency when submitted to ovum pick-up and in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 405–405, 2014.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUS, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.; ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-mullerian hormone: An endocrine marker for invitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 49, n. 1, p. 96–104, 2014.

GUIMARÃES, A. C. G.; LEIVAS, F. G.; SANTOS, F. W.; SCHWENGBER, E. B.; GIOTTO, A. B.; MACHADO, C. I. U.; GONÇALVES, C. G. M.; FOLCHINI, N. P.;

BRUM, D. S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 103–110, 2014.

HAAF, T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 310, p. 13–22, 2006.

HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M.; DONNISON, M. J. Development During Single IVP of Bovine Oocytes From Dissected Follicles : Interactive Effects of Estrous Cycle Stage , Follicle Size and Atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 451–458, 1999.

HALES, B. F.; GRENIER, L.; LALANCETTE, C.; ROBAIRE, B. Epigenetic Programming : From Gametes to Blastocyst. **Birth Defects Research**, v. 665, n. March, p. 652–665, 2011.

HANEKAMP, W. J. A. Transfer of beef embryos in dairy cows: Influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 6, p. 459–463, 1999.

HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. 242–249, 2007.

HANSEN, P. J.; ARÉCHIGA, C. F. Strategies for Managing Reproduction in the Heat-Stressed Dairy Cow 1 ABSTRACT : Introduction : The Changing Nature of the. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 36–50, 1999.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3–4, p. 245–264, 2003.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, 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, n. 94, p. 141–152, 1995.

HASSAN-ALI, H.; HISHAM-SALEH, A.; EL-GEZEIRY, D.; BAGHDADY, I.; ISMAEIL, I.; MANDELBAUM, J. Perivitelline space granularity: A sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, n. 12, p. 3425–3430, 1998.

HEARD, E.; DISTECHE, C. M. Dosage compensation in mammals: Fine-tuning the expression of the X chromosome. **Genes and Development**, v. 20, n. 14, p. 1848–1867, 2006.

HEIJDEN, G. W. VAN DER; DERIJCK, A. A. H. A.; RAMOS, L.; GIELE, M.;

VLAG, J. VAN DER; BOER, P. DE. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. **Developmental Biology**, v. 298, n. 2, p. 458–469, 2006.

HEIJMANS, B. T.; TOBI, E. W.; LUMEY, L. H.; SLAGBOOM, P. E. The epigenome : Archive of the prenatal environment The epigenome. **Epigenetics**, v. 4, p. 526–531, 2009.

HEIJMANS, B. T.; TOBI, E. W.; STEIN, A. D.; PUTTER, H.; BLAUW, G. J.; SUSSER, E. S.; SLAGBOOM, P. E.; LUMEY, L. H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17046–17049, 2008.

HIENDLEDER, S.; MUND, C.; REICHENBACH, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; ZAKHARTCHENKO, V.; LYKO, F.; WOLF, E.; O, P. Tissue-Specific Elevated Genomic Cytosine Methylation Levels Are Associated with an Overgrowth Phenotype of Bovine Fetuses Derived by In Vitro Techniques 1. **Biology of Reproduction**, v. 223, n. March, p. 217–223, 2004.

HILL, C.; JAIN, A.; TAKEMOTO, H.; SILVER, M. D.; NAGESH, S. V. S.; IONITA, C. N.; BEDNAREK, D. R.; RUDIN, S. HHS Public Access. **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**, v. 73, n. 4, p. 389–400, 2015.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for Placental Abnormality as the Major Cause of Mortality in First- Trimester Somatic Cell Cloned Bovine Fetuses 1. **Biology of Reproduction**, v. 1794, p. 1787–1794, 2000.

HIURA, H.; OKAE, H.; MIYAUCHI, N.; SATO, F.; SATO, A.; PETTE, M. Van De; JOHN, R. M.; KAGAMI, M.; NAKAI, K.; SOEJIMA, H.; OGATA, T.; ARIMA, T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human Reproduction**, v.27, p.2541–2548, 2012.

HOWELL, C. Y.; BESTOR, T. H.; DING, F.; LATHAM, K. E.; MERTINEIT, C.; TRASLER, J. M.; CHAILLET, J. R. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 829–838, 2001.

HSUEH, A. J. W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian Follicle Atresia : A Hormonally Controlled Apoptotic Process \*. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 6, 1994.

HUANG, C.; LI, Z.; WANG, M.; MARTORELL, R. Early Life Exposure to the 1959 – 1961 Chinese. **The Journal of Nutriron**, p. 1874–1878, 2010.

HUMBLOT, P. Monitor Pregnancy and Determine the Timing , Frequencies and

Sources of Embryonic Mortality in Ruminants. **Theriogenology**, v. 56, n. 01, p. 1417–1433, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. **Produção da Pecuária Municipal**. Brasília, DF: IBGE. pp. 80.

IBRAHIM, A. E. K.; THORNE, N. P.; BAIRD, K.; BARBOSA-MORAIS, N. L.; TAVARÉ, S.; COLLINS, V. P.; WYLLIE, A. H.; ARENDS, M. J.; BRENTON, J. D. MNAS: An optimized array-based method for assessing CpG island methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 20, 2006.

INBAR-FEIGENBERG, M.; CHOUFANI, S.; PH, D.; BUTCHER, D. T.; PH, D.; ROIFMAN, M. Basic concepts of epigenetics. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 3, p. 607–615, 2013.

INOUE, A.; ZHANG, Y. BREVIA Replication-Dependent Loss of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Preimplantation Embryos. **Science**, v. 334, p. 5, 2011.

IQBAL, K.; JIN, S. G.; PFEIFER, G. P.; SZABÓ, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **PNAS**, v. 108, p. 2–7, 2011.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3S, p. 245–254, 2003.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 93–107, 2000.

JOHNSON, M. H.; ZIOMEK, C. A. The Foundation of Two Distinct within the Mouse Morula. **Cell**, v. 24, n. April, p. 71–80, 1981.

JONES, G. Articles Glucose metabolism of human morula and blastocyst-stage embryos and its relationship to viability after transfer. **Reproductive BioMedicine**, v. 3, n. 2, p. 124–132, 2001.

KAHRAMAN, S.; YAKIN, K.; DO, E.; CENGIZ, G.; SERTYEL, S.; I, N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 15, n. 11, p. 2390–2393, 2000.

KAIKKONEN, M. U.; LAM, M. T. Y.; GLASS, C. K. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. **Cardiovascular Research**, v. 90, n. 3, p. 430–440, 2011.

KALA, M.; NIVSARKAR, M. Role of cortisol and superoxide dismutase in

psychological stress induced anovulation. **General and Comparative Endocrinology**, 2015.

KALLÉN, B.; FINNSTROM, O.; NYGREN, K. G.; OLAUSSON, P. O. In Vitro Fertilization ( IVF ) in Sweden : Risk for Congenital Malformations after Different IVF Methods. **Clinical and Molecular Teratology**, v. 73, p. 162–169, 2005.

KASIMANICKAM, R.; SCHROEDER, S.; ASSAY, M.; KASIMANICKAM, V.; MOORE, D. A.; GAY, J. M.; WHITTIER, W. D. Influence of temperament score and handling facility on stress, reproductive hormone concentrations, and fixed time AI pregnancy rates in beef heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 5, p. 775–782, 2014.

KEVERNE, B. Monoallelic gene expression and mammalian evolution. **BioEssays**, v. 31, n. 12, p. 1318–1326, 2009.

KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R.; KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expression of Imprinted Genes Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expression of Imprinted Genes 1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 918–926, 2001.

KHOUEIRY, R.; KHOUEIRY, R.; IBALA-RHOMDANE, S.; MÉRY, L.; BLACHÈRE, T.; GUÉRIN, J.-F.; LORNAGE, J.; LEFÈVRE, A. Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes. **Journal of medical genetics**, v. 45, n. 9, p. 583–8, 2008.

KIDDER, G. M.; WINTERHAGER, E. Intercellular communication in preimplantation development: The role of GAP junctions. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.731–736, 2001.

KIM, Y. J.; KU, S. .; JEE, B. C.; SUH, C. S.; KIM, S. H.; CHOI, Y. M.; KIM, J. G.; MOON, S. Y. Dynamics of early estradiol production may be associated with outcomes of in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 7, p. 2868–2870, 2010.

KLEIJKERS, S. H. M. *et al.* IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. **Human Reproduction**, v. 29, n. 4, p. 661–669, 2014.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; HERRMANN, D.; WEIJDEN, G. C. VAN DER; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v. 124, n. 3, p. 365–375, 2002.

KOOIJ, R. J. VAN; LOOMAN, C. W. N.; HABBEMA, J. D. F.; DORLAND, M.; VELDE, E. R. TE. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 5, p. 769–775, 1996.

- KOYAMA, K.; KANG, S. S.; HUANG, W.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; NAGANO, M. Aging-related Changes in in vitro-matured bovine oocytes: Oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 2, p. 136–142, 2014.
- KRUIP, T. A. M. Use of Ovum Pick-Up for Embryo. **Theriogenology**, p. 675–684, 1994.
- KRUIP, T. A. M.; BEVERS, M. M.; B.KEMP. Environment of oocyte and embryo determines health of ivo offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 611–618, 2000.
- KRUIP, T. A. M.; BEVERS, M. M.; KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 611–618, 2000.
- KRUIP, T. A. M.; DAAS, J. H. G. DEN. No Title. **Theriogenology**, v. 47, n. 96, p. 43–52, 1997.
- LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; KHALIFA, H. H.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Interactions between climate and animal production. p.15-111, 2003.
- LAMB, G. C. Criteria for selecting replacements at weaning, before breeding, and after breeding. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 567–578, 2013.
- LANDE-DINER, L.; ZHANG, J.; BEN-PORATH, I.; AMARIGLIO, N.; KESHET, I.; HECHT, M.; AZUARA, V.; FISHER, A. G.; RECHAVI, G.; CEDAR, H. Role of DNA methylation in stable gene repression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12194–12200, 2007.
- LAPRISE, S. L. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 11, p. 1006–1018, 2009.
- LARSON, R. L.; WHITE, B. J.; LAFLIN, S. Beef Heifer Development. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 285–302, 2016.
- LASIENE, K.; VITKUS, A.; VALANCIUTE, A.; LASYS, V. Morphological criteria of oocyte quality. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 45, n. 7, p. 509–515, 2009.
- LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos I. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 174–183, 2009.
- LEE, H. L.; KIM, S. H.; JI, D. B.; KIM, Y. J. A comparative study of Sephadex, glass

wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249–255, 2009.

LEPIKHOV, K.; WALTER, J. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. **BMC Developmental Biology**, v. 4, p. 2–6, 2004.

LEROY, J. L. M. R.; RIZOS, D.; STURMEY, R.; BOSSAERT, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; HOECK, V. VAN; VALCKX, S.; BOLS, P. E. J. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: A focus on dairy cow fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2012.

LEROY, J. L. M. R.; SOOM, A. VAN; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; KNEGSEL, A. T. M. VAN; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P. E. J. Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 96–103, 2008.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A. DE; GENICOT, G.; SOOM, A. VAN. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485–495, 2005.

LEROY, J.; SOOM, A. VAN; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 632, p. 623–632, 2008.

LI, E. CHROMATIN MODIFICATION AND EPIGENETIC REPROGRAMMING IN MAMMALIAN DEVELOPMENT. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. September, p. 662–673, 2002.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 915–926, 1992.

LI, X.; ITO, M.; ZHOU, F.; YOUNGSON, N.; ZUO, X.; LEDER, P.; FERGUSON-SMITH, A. C. Article Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. **Developmental Cell**, v. 15, n. 4, p. 547–557, 2008.

LI, Y.; HE, Y.; QI, L.; JADDOE, V. W.; FESKENS, E. J. M.; YANG, X.; MA, G.; HU, F. B. Exposure to the Chinese Famine in Early Life and the Risk of Hyperglycemia and

Type 2 Diabetes in Adulthood. **Diabetes Journal**, v. 59, n. October, p. 2400–2406, 2010.

LOEFFLER, S. H.; VRIES, M. J. DE; SCHUKKEN, Y. H.; ZEEUW, A. C. DE; DIJKHUIZEN, A. A.; GRAAF, F. M. DE; BRAND, A. Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in holstein dairy cows. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1267–1284, 1999.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 255–268, 2016.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 2006.

LOPEZ, W. O. C.; ALVIS-MIRANDA, H. R.; FELIPE, A.; RENDON, B.; ARMANDO, D.; BORDA, V.; ALBICKER, U.; TALAMONI, E.; MARTINEZ-DIAZ, M. Effects of sexed semen and interactive effects on commercial in vitro embryo production when oocytes are collected from cows of *Bos indicus*, and *Bos taurus* breeding and crossbred cows of these subspecies. **Animal Reproduction Science**, p. 2–7, 2015.

LUDWIG, M.; KATALINIC, A.; GROSS, S.; SUTCLIFFE, A.; VARON, R.; HORSTHEMKE, B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. **Journal of medical genetics**, v. 42, n. 4, p. 289–91, 2005.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 301–307, 1987.

LYKERIDOU, K.; GOUROUNTI, K.; SARANTAKI, A.; LOUTRADIS, D.; VASLAMATZIS, G.; DELTSIDOU, A. Occupational social class, coping responses and infertility-related stress of women undergoing infertility treatment. **Journal of Clinical Nursing**, v. 20, n. 13–14, p. 1971–1980, 2011.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; FILHO, E. S.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289–1297, 2009.

MAINIGI, M. A.; OLALERE, D.; BURD, I.; SAPIENZA, C.; BARTOLOMEI, M.; COUTIFARIS, C. Peri-Implantation Hormonal Milieu : Elucidating Mechanisms of Abnormal Placentation and Fetal Growth. **Biology of Reproduction**, p. 1–17, 2013.

MAJERUS, V.; ROOVER, R. DE; ETIENNE, D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Embryo production bi ovum pick up in unstimulated calves before and

after puberty. **Theriogenology**, v. 52, n. 99, p. 1169–1179, 1999.

MANSOURI-ATTIA, N.; SANDRA, O.; AUBERT, J.; DEGRELLE, S.; EVERTS, R. E.; GIRAUD-DELVILLE, R. E.; HEYMAN, Y.; GALIO, L.; HUE, I.; YANG, X.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo. **PNAS**, v. 106, n. 14, p. 1–6, 2009.

MARKET-VELKER, B. A.; ZHANG, L.; MAGRI, L. S.; BONVISSUTO, A. C.; MANN, M. R. W. Dual effects of superovulation: Loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 1, p. 36–51, 2009.

MARTEIL, G.; RICHARD-PARPAILLON, L.; KUBIAK, J. Z. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. **Reproductive Biology**, v. 9, n. 3, p. 203–224, 2009.

MATOBA, S.; HARA, L. O.; CARTER, F.; KELLY, A. K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 1257–1266, 2011.

MAUNAKEA, A. K.; CHEPELEV, I.; ZHAO, K. The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at: **Journal of the American Heart Association**, v. 107, p. 327–339, 2010.

MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 126, p. 125–126, 2000.

MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. **Developmental Biology**, v. 262, n. 1, p. 1–15, 2003.

MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; NAQVI, S. M. S. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2–4, p. 141–148, 2009.

MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; TRAVERSO, J. M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 393–400, 2008.

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

MERTON, J. S.; ROOS, A. P. W. DE; MULLAART, E.; RUIGH, L. DE; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in

commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651–674, 2003.

MESSERSCHMIDT, D. M.; KNOWLES, B. B.; SOLTER, D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. **Genes and Development**, v. 28, p. 812–828, 2014.

MIKKOLA, M.; ANDERSSON, M.; TAPONEN, J. Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1118–1122, 2015.

MITTELDORF, J. J.; GOODNIGHT, C. Post-reproductive life span and demographic stability. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 9, p. 1013–1022, 2013.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 61–72, 2003.

MOHAMED, J. S.; GAUGHWIN, P. M.; LIM, B.; ROBSON, P.; LIPOVICH, L. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Rna**, v. 16, n. 2, p. 324–337, 2010.

MONTEIRO, F. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; BAYEUX, B. M.; ACCORSI, M.; CAMPANHOLI, S. P.; DIAS, E. A. R.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Beef donor cows with high number of retrieved CCO produce more in vitro embryos compared with cows with low number of CCO after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v. 90, p. 54–58, 2017.

MOREY, C.; AVNER, P. Genetics and epigenetics of the X chromosome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 18–33, 2011.

MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; SIQUEIRA, E. R.; LISBOA, L. A.; SENEDA, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 696–701, 2014.

MUTTER, G. L. Role of imprinting in abnormal human development. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 396, n. 1–2, p. 141–147, 1997.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro. **Zygote**, v. 14, p. 53–61, 2006.

NAKAMURA, T.; ARAI, Y.; UMEHARA, H.; MASUHARA, M.; KIMURA, T.; TANIGUCHI, H.; SEKIMOTO, T.; IKAWA, M.; YONEDA, Y.; OKABE, M. PGC7 / Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. **Nature Cell Biology**, v.9, p.64–79, 2007.

NETO, H. F. V.; SILVA, J. C. F.; PEREIRA, L. C.; ANDRADE, J. C. O.; MOURA, M. T.; BARTOLOMEU, C. C.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos in vitro [ Parameters affecting the pregnancy rate in recipients females of bovine embryos produced in vitro ]. **Medicinia Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 31–35, 2014.

NOONAN, E. J.; KELLY, J. C.; BEGGS, D. S. Factors associated with fertility of nulliparous dairy heifers following a 10-day fixed-time artificial insemination program with sex-sorted and conventional semen. **Australian Veterinary Journal**, v. 94, n. 5, p. 145–148, 2016.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 1–2, p. 13–20, 2000.

O'NEILL, L. P.; VERMILYEA, M. D.; TURNER, B. M. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 835–841, 2006.

OBUCHI T., OSADA, M, OZAWA T., NAKAGAWA, H., HAYASHI M., AKIYAMA K., SAKAGAMI N., MIURA, R., GESHI M., U. H. Journal of Reproduction and Development. 2019.

OGDEN, J.; STAVRINAKI, M.; STUBBS, J. Understanding the role of life events in weight loss and weight gain. **Psychology, Health and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 239–249, 2009.

OHNISHI, Y.; TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; WATANABE, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUNAGA, K.; SAKAKI, Y.; SASAKI, H.; HOHJOH, H. Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 15, p. 5141–5151, 2010.

OKAMOTO, I.; HEARD, E. Lessons from comparative analysis of X-chromosome inactivation in mammals. **Chromosome Research**, v. 17, n. 5, p. 659–669, 2009.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. DE; PERINI, A. P.; RESENDE, M. V.; MIGUEL, M. C. V.; LUCIO, A. C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 9–15, 2012.

OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. **Gamete**

**Research**, v. 20, n. 2, p. 159–164, 1988.

OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology**, v. 10, n. 8, p. 475–478, 2000.

OTANI, J.; NANKUMO, T.; ARITA, K.; INAMOTO, S.; ARIYOSHI, M.; SHIRAKAWA, M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. **EMBO Reports**, v. 10, n. August, p. 1235–1241, 2009.

OTAVA, G. Comparative Study of Conception Rate on Heifers Artificially Inseminated With Sexed and Conventional Semen. **Lucrări Științifice Medicină Veterinară**, v. XLIII, n. 2, p. 46–51, 2010.

OWEN, C. M.; SEGARS, J. H. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 417–428, 2009.

PAINTER, R. C.; ROOIJ, S. R. DE; BOSSUYT, P. M.; SIMMERS, T. A.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; BLEKER, O. P.; ROSEBOOM, T. J. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 2, p. 322–327, 2006.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257–262, 2004.

PAN, Z.; ZHANG, J.; LI, Q.; LI, Y.; SHI, F.; XIE, Z.; LIU, H. Current Advances in Epigenetic Modification and Alteration during Mammalian Ovarian Folliculogenesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 39, n. 3, p. 111–123, 2012.

PANARACE, M.; AGUERO, J. GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L.; GUTIERREZ, L.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, S.; GARNIL, C.; FORTES-PONTES, JE.; ERENO JUNIOR, JE.; MOWER, S.; MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 142–151, 2007.

PARR, M. H.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; DISKIN, M. G. The concurrent and carry over effects of long term changes in energy intake before insemination on pregnancy per artificial insemination in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 87–94, 2015.

PATTON, J.; KENNY, D. A.; MCNAMARA, S.; MEE, J. F.; O'MARA, F. P.; DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 649–658, 2007.

PAULA-LOPES, F. F.; LIMA, R. S.; SATRAPA, R. A.; BARROS, C. M. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Influence of cattle genotype ( *Bos indicus* vs . *Bos taurus* ) on oocyte and preimplantation embryo. **Journal Animal Science**, v. 91, p. 1143–1153, 2013.

PAULO, S.; SALA, R. V. Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação. 2013.

PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; SUYAMA, E.; CARVALHO, M. R. S.; PENNA, V. M. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* × *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 287–292, 2007.

PELLEGRINO, C. A. G.; MOROTTI, F.; UNTURA, R. M.; PONTES, J. H. F.; PELLEGRINO, M. F. O.; CAMPOLINA, J. P.; SENEDA, M. M.; BARBOSA, F. A.; HENRY, M. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*–produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 888–893, 2016.

PERERA, F.; HERBSTMAN, J. Prenatal environmental exposures, epigenetic, and disease. **Reproduction Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 363–373, 2011.

PERRY, G. 2015 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC. **International Embryo Transfer Society**, n. Table 2, p. 1–16, 2016.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Stem Cells Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. **Stem Cells**, v. 19, p. 271–278, 2001.

PESSIA, E.; MAKINO, T.; BAILLY-BECHET, M.; MCLYSAGHT, A.; MARAIS, G. A. B. Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 14, p. 5346–5351, 2012.

PONTES, J. H.; SILVA, K. C.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P.; VIEIRA, P. H.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, 74 (8): 1349-1355, 2010.

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, n. 9, p. 1640–1646, 2011.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.;

UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.

PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Review Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, p. 629–641, 2009.

POPP, C.; DEAN, W.; FENG, S.; COKUS, S. J.; ANDREWS, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1101–1105, 2010.

PRYCE, J. E.; COFFEY, M. P.; SIMM, G. The relationship between body condition score and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1508–1515, 2001.

PUUMALA, S. E.; NELSON, H. H.; ROSS, J. A.; NGUYEN, R. H. N.; DAMARIO, M. A.; SPECTOR, L. G. Similar DNA methylation levels in specific imprinting control regions in children conceived with and without assisted reproductive technology: A cross-sectional study. **BMC Pediatrics**, v. 12, p. 17–20, 2012.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; LEPIKHOV, K.; SALAMONE, D.; WALTER, J.; NIEMANN, H. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 6, p. 738–748, 2009.

RAVELLI, A. C. J.; MEULEN, J. H. P. Van Der; MICHELS, R. P. J.; OSMOND, C.; BARKER, D. J. P.; HALES, C. N.; BLEKER, O. P. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **The Lancet**, v. 351, p.173–177, 1998.

REAMON-BUETTNER, S. M.; BORLAK, J. A new paradigm in toxicology and teratology: Altering gene activity in the absence of DNA sequence variation. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 20–30, 2007.

REIK, W. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089–1093, 2001.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–432, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089–1093, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, 2001.

RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow — a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139–1151, 2003.

RÉRAT, M.; ZBINDEN, Y.; SANER, R.; HAMMON, H.; BLUM, J. W. In vitro embryo production: Growth performance, feed efficiency, and hematological, metabolic, and endocrine status in calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2579–2593, 2005.

REXHAIJ, E.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; RIMOLDI, S. F.; FUSTER, D. G.; ANDEREGG, M.; SOMM, E.; BOUILLET, E.; ALLEMANN, Y. Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 12, p. 5052–5060, 2013.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41–49, 1994.

RIMOLDI, S. F.; SARTORI, C.; REXHAIJ, E.; BAILEY, D. M.; MARCHI, S. F. DE; MCENENY, J.; ARX, R. VON; CERNY, D.; GERMOND, M.; ALLEMANN, Y.; SCHERRER, U. Antioxidants improve vascular function in children conceived by assisted reproductive technologies : A randomized double-blind placebo-controlled trial. **European Journal of Preventive Cardiology**, p. 1–9, 2014.

RÍOS, G. L.; BUSCHIAZZO, J.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of invitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 874–880, 2015.

RIVERA, M. Special Issue : SBiRM : Focus on Fertilization Epigenetic Aspects of Fertilization and Preimplantation Development in Mammals : Lessons from the Mouse. p. 388–404, 2010.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; LA FUENTE, J. DE; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236–243, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P. A. T.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of Bovine Oocyte Maturation , Fertilization or Early Embryo Development In Vitro Versus In Vivo : Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 248, n. May 2001, p. 234–248, 2002.

ROBERTS, A. J.; GOMES DA SILVA, A.; SUMMERS, A. F.; GEARY, T. W.; FUNSTON, R. N. Developmental and reproductive characteristics of beef heifers classified by pubertal status at time of first breeding. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 12, p. 5629–5636, 2017.

ROOKE, J. A.; AINSLIE, A.; WATT, R. G.; ALINK, F. M.; MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Dietary carbohydrates and amino acids influence oocyte quality in dairy heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 3, p. 419–427, 2009.

ROSEKRANS, C. F.; FIRST, N. L. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 266, 1991.

ROSENBLUTH, E. M.; SHELTON, D. N.; SPARKS, A. E. T.; DEVOR, E.; CHISTENSON, L.; VOORHIS, B. J. VAN. MicroRNA expression in the human blastocyst. **Reproductive Biology**, n. 10, p. 1–7, 2013.

ROSS, P. J.; CANOVAS, S. Mechanisms of epigenetic remodelling during preimplantation development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 25–40, 2016.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 737–744, 2001.

ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 932–939, 2008.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 83–90, 2000.

RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. B. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 4, p. 345–357, 2008.

SAITOU, M.; KAGIWADA, S.; KURIMOTO, K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. **Development**, v. 139, n. 1, p. 15–31, 2012.

SAKKA, S. D.; LOUTRADIS, D.; PH, D.; KANAKA-GANTENBEIN, C.; PH, D. Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 5, p. 1693–1699, 2010.

SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and Developmental Evidence That Ooplasmic Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes Is Compromised. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1761–1768, 2001.

SALES, J. N. S.; IGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P.; QUINTÃO, C. C. R.; GAMA, M. A. S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3086–3099, 2015.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRIC, J.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 3–4, p. 237–247, 2006.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; COLOMBO PEREIRA, M. H.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147–1151, 2016.

SÁNCHEZ, Z.; LAMMOGLIA, M. A.; ALARCÓN, M. A.; ROMERO, J. J.; GALINA, C. S. Is the Production of Embryos in Small-Scale Farming an Economically Feasible Enterprise? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 574–579, 2015.

SANTOS, A. P.; ABRANCHES, R.; STOGER, E.; BEVEN, A.; VIEGAS, W.; SHAW, P. J. The architecture of interphase chromosomes and gene positioning are altered by changes in DNA methylation and histone acetylation. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 23, p. 4597–4605, 2002.

SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Developmental Biology**, v. 241, n. 1, p. 172–182, 2002.

SANTOS, G. M. G. DOS; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z. DE; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 165, p. 17–21, 2016.

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

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

SARTORI, R.; PRATA, A.; FIGUEIREDO, A.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C.S.; VIANA, J. H.M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L.M.; PEREIRA, M. H.C.; DODE, M. A.N.; MONTEIRO, P. L.J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on

assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905–920, 2004.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2813–2822, 2002.

SARTORI, R.; SPIES, C.; WILTBANK, M. C. Effects of dry matter and energy intake on quality of oocytes and embryos in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 58–65, 2017.

SARTORI, ROBERTO; SPIES, C.; WILTBANK, M. C. Effects of dry matter and energy intake on quality of oocytes and embryos in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 58–65, 2017.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p. 129–140, 2008.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722–728, 2013.

SCHERRER, U.; REXHAJ, E.; ALLEMANN, Y.; SARTORI, C.; RIMOLDI, S. F. Clinical update Cardiovascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. **European Heart Journal**, v. 36, p. 1583–1589, 2015.

SCHIER, A. F. The Maternal-Zygotic transition: Death and Birth of RNAs. **Germ Cells**, v. 316, p. 406–407, 2007.

SCHIMIDT, M.; AVERY, G. B.; BECKERS, J. F.; SULON, J.; HANSEN, H. B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, n. 96, p. 527–539, 1996.

SCHULTZ, R. M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 4, p. 323–331, 2002.

SEISENBERGER, S.; PEAT, J. R.; HORE, T. A.; DEAN, W.; REIK, W.; REIK, W.; SEISENBERGER, S. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 95, p. 1–11, 2017.

SELESNIEMI, K.; LEE, H.; TILLY, J. L. Moderate caloric restriction initiated in

rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. **Aging Cell**, n. May, p. 622–629, 2008.

SENEDA, M. M.; BLASCHI, W.; LISBOA, L. A. Aspiração folicular in vivo : metodologias , eficiência e seqüelas. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 16, p. 1–9, 2005.

SEPÚLVEDA, B.; ARIAS, M. E.; AGUILA, L.; ZAMBRANO, F.; SÁNCHEZ, R.; FELMER, R. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? **Andrologia**, v. 50, n. 3, p. 1–7, 2018.

SERHAL, P. F.; RANIERI, D. M.; KINIS, A.; MARCHANT, S.; DAVIES, M.; KHADUM, I. M. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, n. 6, p. 1267–1270, 1997.

SHARMA, R.; BIEDENHARN, K. R.; FEDOR, J. M.; AGARWAL, A. Lifestyle factors and reproductive health: Taking control of your fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2013.

SHI, W.; HAAF, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 3, p. 329–334, 2002.

SILKE, V.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A.; BOLAND, M. P.; MEE, J. F.; SREENAN, J. M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 71, n. 1–2, p. 1–12, 2002.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F. Science : In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. **Animal Science**, v. 60, p. 55–64, 1995.

SINCLAIR, K. D.; YOUNG, L. E.; WILMUT, I.; MCEVOY, T. G. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: Lessons from mice and a warning to men. **Human Reproduction**, v. 15, p. 68–86, 2000.

SIQUEIRA, L. G.; ARASHIRO, E. K.; GHETTI, A. M.; SOUZA, E. D.; FERES, L. F.; PFEIFER, L. F.; FONSECA, J. F.; VIANA, J. H. Vascular and morphological features of the corpus luteum 12 to 20 days after timed artificial insemination in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5612–5622, 2019.

SIQUEIRA, L. G. B.; DIKMEN, S.; ORTEGA, S.; HANSEN, P. J. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. **Journal Dairy Science**, p. 1–10, 2017.

SIRARD, M. A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model.

**Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 4, p. 411–417, 2017.

SNELL, W. J.; WHITE, J. M. The molecules of mammalian fertilization. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 629–637, 1996.

SPONCHIADO, M.; GONELLA-DIAZA, A. M.; ROCHA, C. C.; TURCO, E. G. L.; PUGLIESI, G.; LEROY, J. L. M. R.; BINELLI, M. The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition in vivo. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **BSAP Occasional Publication**, v. 26, n. 1, p. 93–104, 2001.

STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K. Metabolism of Glucose , Pyruvate , and Glutamine During the Maturation of Oocytes Derived From Pre-Pubertal and Adult Cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 101, n. May, p. 92–101, 1999.

STEIN, A. D.; KAHN, H. S.; RUNDLE, A.; ZYBERT, P. A.; BRUIN, K. V. D. P. DE; LUMEY, L. H. Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation : evidence from the Dutch famine. **Americ**, v. 85, n. 2, p. 869–876, 2007.

STITZEL, M. L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. **Science**, v. 316, n. 5823, p. 407–408, 2007.

STREHLER, E.; BACCETTI, B.; STERZIK, K.; CAPITANI, S.; COLLODEL, G.; SANTO, M. DE; GAMBERA, L.; PIOMBONI, P. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae 13). **Human Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 120–123, 1998.

SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 6, p. 557–582, 2003.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 155–163, 2001.

SUSSER, E. B.; BROWN, A.; MATTE, T. D. Prenatal factors and adult mental and physical health. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 326–334, 1999.

SUTCLIFFE, A. G.; PETERS, C. J.; BOWDIN, S.; TEMPLE, K.; REARDON, W.; WILSON, L.; CLAYTON-SMITH, J.; BRUETON, L. A.; BANNISTER, W.; MAHER, E. R. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders - A preliminary British survey. **Human Reproduction**, v. 21, n. 4, p. 1009–1011, 2006a.

SUTTIROJPATTANA, T.; SOMFAI, T.; MATOBA, S.; NAGAI, T.; PARNPAI, R.; GESHI, M. Effect of storage tube material and resveratrol during liquid storage of matured bovine oocytes on subsequent development. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 546–555, 2017.

TAKAHASHI, T.; IGARASHI, H.; KAWAGOE, J.; AMITA, M.; HARA, S.; KURACHI, H. Poor Embryo Development in Mouse Oocytes Aged In Vitro Is Associated with Impaired Calcium Homeostasis1. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 3, p. 493–502, 2009.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, A. VAN DE; JU, J.-C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206–213, 2000.

TERAKADO, A. P. N.; PEREIRA, M. C.; YOKOO, M. J.; ALBUQUERQUE, L. G. Evaluation of productivity of sexually preCCOious Nelore heifers. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 6, p. 938–943, 2014.

THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, p. 57–74, 2012.

THOMPSON, J. G. No Title. **Theriogenology**, v. 45, n. 95, p. 27–40, 1996.

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

TILLY, J. L.; SINCLAIR, D. A. Germline energetics, aging and female infertility. **Cell Metabolics**, v. 17, n. 6, p. 838–850, 2014.

TIWARI, M.; PRASAD, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, A. N.; SINGH, A. K.; SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Involvement of Reactive Oxygen Species in Meiotic Cell Cycle. **Reactive oxygen species**, v. 1, n. 2, p. 110–116, 2016.

TOBI, E. W.; SLAGBOOM, P. E.; DONGEN, J. VAN; KREMER, D.; STEIN, A. D.; PUTTER, H.; HEIJMANS, B. T.; LUMEY, L. H. Prenatal famine and genetic variation are independently and additively associated with dna methylation at regulatory loci within IGF2/H19. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–11, 2012.

TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Assessing the quality of oocytes derived from in vitro maturation: Are we looking under the lamppost? **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 4, p. 839–840, 2006.

TRIPATHI, A.; KHATUN, S.; PANDEY, A. N.; MISHRA, S. K.; CHAUBE, R.;

SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. **Free Radical Research**, v. 43, n. 3, p. 287–294, 2009.

TYCKO, B.; MORISON, I. A. N. M. Physiological Functions of Imprinted Genes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. April, p. 245–258, 2002.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803–815, 2014.

VALENZUELA-ALCARAZ, B.; CRISPI, F.; BIJNENS, B.; CRUZ-LEMINI, M.; SITGES, M. Assisted Reproductive Technologies Are Associated With Cardiovascular Remodeling In Utero That Persists Postnatally. **Pediatric Cardiology**, v. 128, p. 1442–1451, 2013.

VELKER, B. A. M.; DENOMME, M. M.; MANN, M. R. W. Embryo culture and Epigenetics. *In: Embryo culture: Methods and Protocols*. [s.l: s.n.]. v. 912p. 399–420.

VERMEIDEN, J. P. W.; PH, D.; BERNARDUS, R. E.; PH, D. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 3, p. 642–651, 2013.

VERMILYEA, M. D.; NEILL, L. P. O.; TURNER, B. M. Transcription-Independent Heritability of Induced Histone Modifications in the Mouse Preimplantation Embryo. **PLOS One**, v. 4, n. 6, p. 1–9, 2009.

VIANA, J. H. Features and perspectives of Brazilian embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12–18, 2012.

VIANA, J. H. .; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JÚNIOR, 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.; 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.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476–481, 2017.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; NETTO, A. C.; GUERREIRO, B. M.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to

improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, 2014.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L. Transcription Factor Expression Patterns in Bovine In Vitro-Derived Embryos Prior to Maternal-Zygotic Transition 1. v. 1709, n. February, p. 1701–1709, 2004.

VISWANATHAN, S. R.; MERMEL, C. H.; LU, J.; LU, C. W.; GOLUB, T. R.; DALEY, G. Q. MicroRNA expression during trophectoderm specification. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 17–19, 2009.

VOS, A. DE; NAGY, Z. R.; VELDE, H. VAN DE; JORIS, H.; BOCKEN, G.; STEIRTEGHEM, A. VAN. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, n. 9, p. 1980–1984, 1997.

WAAL, E. DE; VROOMAN, L. A.; FISCHER, E.; ORD, T.; MAINIGI, M. A.; COUTIFARIS, C.; SCHULTZ, R. M.; BARTOLOMEI, M. S. The cumulative effect of assisted reproduction procedures on placental development and epigenetic perturbations in a mouse model. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 24, p. 6975–6985, 2015.

WAAL, E. DE; YAMAZAKI, Y.; INGALE, P.; BARTOLOMEI, M. S.; YANAGIMACHI, R.; MCCARREY, J. R. Gonadotropin stimulation contributes to an increased incidence of epimutations in ICSI-derived mice. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 20, p. 4460–4472, 2012.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. December 2011, p. 10–13, 2012.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A. . VAN; AERTS, B. J. G.; DAAS, J. H. . DEN. No Title. **Theriogenology**, v. 49, n. 98, p. 883–894, 1998.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. VAN. Ovum Pick Up and in Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, n. 5 SPEC. ISS., p. 914–925, 2006.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. VAN; MULLAART, E.; ROOS, A. P. W. DE; MERTON, J. S.; DAAS, J. H. G. DEN; KEMP, B.; RUIGH, L. DE. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 575–597, 2000.

WALKER, S. K.; HARTWICH, K. M.; SEAMARK, R. F. The Production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology**, v. 45, n. 95, p. 111–120, 1996.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n.

3–4, p. 127–138, 2011.

WANG, Q.; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 2006, p. 1–12, 2007.

WASSARMAN, P. M.; GUSTAVE, O.; PLACE, L. L. Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. **Cell**, v. 96, p. 175–183, 1999.

WATANABE, T., TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; KANEDA, M.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, M.; OBATA, Y.; CHIBA, H.; KOHARA, Y.; KONO, T.; NAKANO, T.; SURANI, M. A. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 539–543, 2008.

WATKINS, A. J.; FLEMING, T. P. Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: The heart of the matter. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 52–59, 2009.

WATSON, A. J. The cell biology of blastocyst development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, n. 4, p. 492–504, 1992.

WATSON, A. J.; DAMKY, C. H.; KIDDER, A. M. Differentiation of an Epithelium: Factors Affecting the Polarized Distribution of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Mouse Trophoblast. **Developmental Biology**, v. 114, p. 104–114, 1990.

WEBER, M.; HELLMANN, I.; STADLER, M. B.; RAMOS, L.; PAABLO, S.; REBHAN, M.; SCHUBELER, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 457–466, 2007.

WEKSBERG, R. Imprinted Genes and Human Disease. **American Journal of Medical Genetics**, v. 320, p. 317–320, 2010.

WHEELER, M. B.; RUTLEDGE, J. J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D. J. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 219–227, 2006.

WHITELAW, N. C.; WHITELAW, E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 18, n. 3, p. 273–279, 2008.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; MATTEO, L. DI; ALVIGGI, C.; PISATURO, M. L.; LOMBARDI, L.; PLACIDO, G. DE. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 909–917, 2001.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17–29, 2006.

WOHLRES-VIANA, S.; ARASHIRO, E. K. N.; MINARE, T. P.; FERNANDES, C. A. C.; GRAZIA, J. G. V.; SIQUEIRA, L. G. B.; MACHADO, M. A.; VIANA, J. H. M. Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle. **Theriogenology**, v. 126, p. 68–74, 2019.

WOHLRES-VIANA, S.; MUNK, M.; HENRIQUE, J.; VIANA, M. Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vivo or in vitro. **Livestock Science**, v. 140, p. 62–67, 2011.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 535–547, 2000.

WOLFFE, A. P.; GUSCHIN, D. Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. **Journal of Structural Biology**, v. 129, p. 102–122. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4217, 2000.

WOSSIDLO, M.; NAKAMURA, T.; LEPIKHOV, K.; MARQUES, C. J.; ZAKHARTCHENKO, V.; BOIANI, M.; ARAND, J.; NAKANO, T.; REIK, W.; WALTER, J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; GEBERT, C.; KORSawe, K.; LEMME, E.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Epigenetic Reprogramming throughout Preimplantation Development and Consequences for Assisted Reproductive Technologies. **Birth Defects Research**, v. 9, n. Part C, p. 1–9, 2005.

XU, M. Q.; SUN, W. S.; LIU, B. X.; FENG, G. Y.; YU, L.; YANG, L.; HE, G.; SHAM, P.; SUSSER, E.; CLAIR, D. ST.; HE, L. Prenatal malnutrition and adult Schizophrenia: Further evidence from the 1959-1961 chinese famine. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 568–576, 2009.

XU, M.; SUN, W.; LIU, B.; SHAM, P.; SUSSER, E.; CLAIR, D. S. Prenatal Malnutrition and Adult Schizophrenia : Further Evidence From the 1959-1961 Chinese Famine. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 568–576, 2009.

YADAV, P. S.; KHANNA, S.; HOODA, O. K.; SETHI, R. K. Effect of Oviductal Cell Co-Culture on Cleavage and Development of Buffalo IVF Embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 7, p. 894–896, 2000.

YAMANAKA, Y.; RALSTON, A.; STEPHENSON, R. O.; ROSSANT, J. Cell and Molecular Regulation of the Mouse Blastocyst STRATEGIES OF EARLY. **Developmental Dynamics**, n. June, p. 2301–2314, 2006.

YANG, Y.; BAI, W.; ZHANG, L.; YIN, G.; WANG, X.; WANG, J.; ZHAO, H.; HAN, Y.; YAO, Y. Q. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 9, p. 2315–2327, 2008.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth. **Nature**, v. 27, p. 153–154, 2001.

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

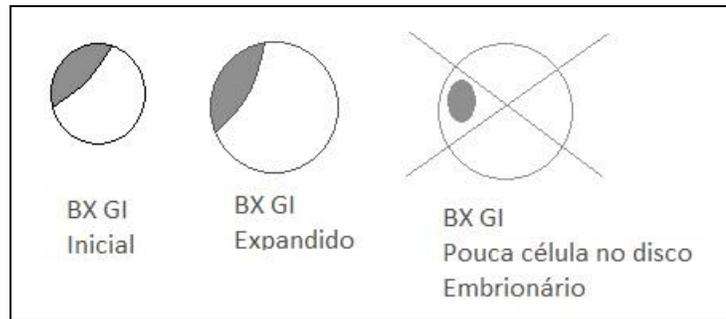
ZHANG, N. A. N.; WAKAI, T.; FISSORE, R. A. Caffeine Alleviates the Deterioration of Ca<sup>2+</sup> Release Mechanisms and Fragmentation of In Vitro-Aged Mouse Eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 701, p. 684–701, 2011.

ZILLER, M. J. *et al.* Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. **Plos Genetics**, v. 7, n. 12, p. 1–15, 2011.

## ANEXO I

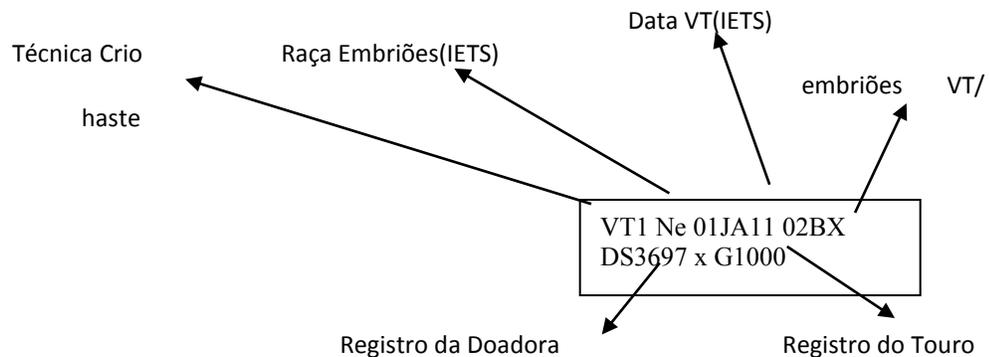
### SELEÇÃO DOS EMBRIÕES VITRIFICÁVEIS

Selecionar os embriões BX I de excelente qualidade.



Registrar na ficha de vitrificação a quantidade de embriões aptos, por doadora.

Identificar haste de vitrificação com fita rotuladora ou caneta de ponta fina, seguindo regra abaixo;



### A. Solução para vitrificação

#### 1. Meio (MLD) 200ul/Palheta.

| Componentes | q.s.p. 7,5ml | q.s.p. 15 ml | q.s.p. 30 ml |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| TCM Hepes   | 6,0 ml       | 12,0ml       | 24,0ml       |
| SFB         | 1,5 ml       | 3,0ml        | 6,0ml        |

#### 2. Solução (SP) (único meio filtrado) para preparar MV2

| Componentes | q.s.p. 1 ml | q.s.p. 2 ml | q.s.p. 3 ml | q.s.p. 5 ml | q.s.p. 10 mL |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| MLD         | 1ml         | 2ml         | 3ml         | 5ml         | 10,0ml       |
| CS          | 0,17116g    | 0,34232g    | 0,5135g     | 0,8558g     | 1,7115g      |

#### 3. Solução de Vitrificação (MV1) 200ul/palheta

| Componentes | q.s.p. 0,5 ml | q.s.p. 2 ml | q.s.p. 3 ml | q.s.p. 4 ml | q.s.p. 5 ml | q.s.p. 6 ml |
|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>MLD</b>  | 425µl         | 1,7ml       | 2,55ml      | 3,4ml       | 4,25ml      | 5,10ml      |
| <b>CP1</b>  | 37,5µl        | 150µl       | 225µl       | 300µl       | 375µl       | 450µl       |
| <b>CP2</b>  | 37,5µl        | 150µl       | 225µl       | 300µl       | 375µl       | 450µl       |

#### 4. Solução de Vitrificação (MV2) 50ul/palheta

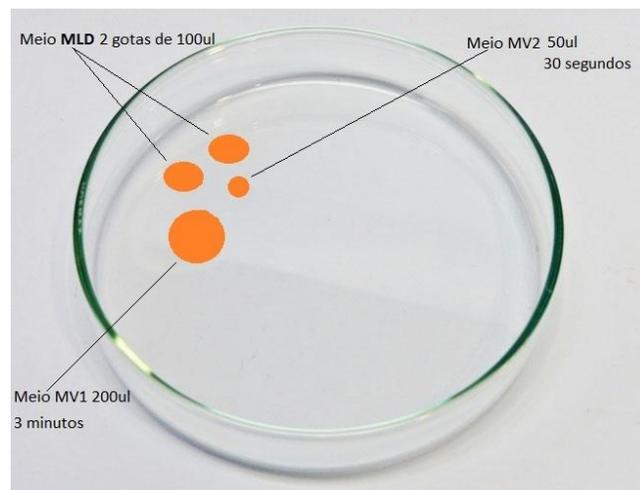
| Componentes | q.s.p. 1 ml | q.s.p. 2 ml |
|-------------|-------------|-------------|
| <b>SP</b>   | 670µl       | 1,34ml      |
| <b>CP1</b>  | 165µL       | 330µl       |
| <b>CP2</b>  | 165µL       | 330µl       |

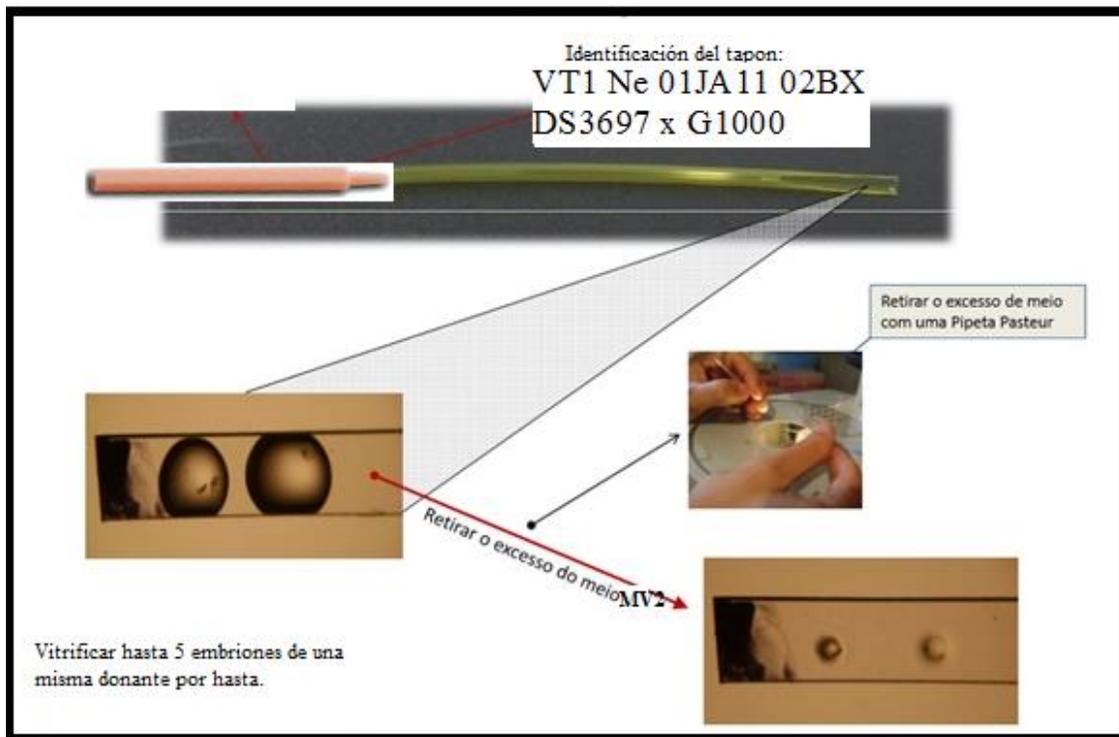
#### 5. PROCEDIMENTO.

- ✓ Posicionar placa de 100mm no canto esquerdo e haste a ser usada no canto direito sobre a lupa (para canhotos inverter a posição).
  - ✓ Retirar a placa contendo os primeiros embriões a serem vitrificados.
  - ✓ Fazer duas gotas de 100ul de meios **MLD** na placa de 100mm.
  - ✓ Transferir até 5 embriões de uma mesma doadora para primeira gota e logo para segunda gota de meios **MLD** com pipeta P10. Não haverá marcação de tempo para permanência dos embriões nessas gotas, porém não tardar em seguir próximo passo.
  - ✓ Fazer uma gota de 200ul de meio **MV1** na placa de 100mm.
  - ✓ Lavar pipeta três vezes no meios **MV1** e descartar todo o líquido interno, em seguida estabilizar colunas desse meio dentro da pipeta como mostra esquema a seguir.
  
  - ✓ Depositar uma pequena porção de meio **MV1** sobre os embriões que estão no meio **MLD** antes de transferir para a gota de **MV1**.
  - ✓ Transferir os embriões para gota de **MV1**, depositando-os na posição 12Hs da gota e iniciar contagem de tempo. Descarta meio contido na pipeta e volte a estabilizar as colunas de meio novamente. Meio/ar/meio.
  - ✓ Durante o primeiro minuto pipetar de dispensar os embriões nas posições 3hs, 6hs, 9hs e finaliza depositando no centro da gota de MV1 em posição alinhada.
- 
- ✓ Essa mudança de posições deve levar mais ou menos 1 minuto. Os embriões deverão ficar na gota de **MV1** por 3 minutos.
  - ✓ Depois de passado 2 minutos em MV1 fazer gota de 50ul de **MV2**.
  - ✓ Lavar pipeta em MV2 e preparar colunas, meio/ar/meio.
  - ✓ Manter os embriões no foco da lupa em Zoo reduzido.

- ✓ Faltando 15 segundos para finalizar o tempo de permanência dos embriões em **MV1**, iniciar contagem em ordem decrescente, 15,14,13.....até 0.
- ✓ Nesse momento, quando a contagem estiver em -10 segundos, depositar pequena porção de meio **MV2** sobre os embriões que estão em **MV1** e imediatamente transferir para gota de **MV2**.
- ✓ Iniciar contagem progressiva de 1 a 30 segundos, pipetando e dispensando os embriões na gota. Quando a contagem estiver em 10 segundos, pipetar os embriões, mantendo-os o mais próximo uns dos outros, e também mais próximos da ponta da pipeta como mostra figura a seguir.
- ✓ Passar os embriões para a haste de vitrificação, checando a quantidade de embriões depositados na haste e em seguida remova o excesso de meio MV2 .
- ✓ Imergir a ponta da haste contendo embriões no nitrogênio liquido e sustentando na posição por aproximadamente 5 segundos. Em seguida soltar a haste no nitrogênio.
- ✓ Envasar as hastes no globet mantendo lacrador para cima, travar embriões com globet superior invertido e perfurado para que a haste não boiar no nitrogênio.
- ✓ Transferir para botijão, mantendo sempre o volume de nitrogênio seguro.

### ORGANIZAÇÃO DAS GOTAS NA PALHETA





## Solução para desvitrificação

### 1. Meio (MLD)

| Componentes | q.s.p. 10ml | q.s.p. 15 ml | q.s.p. 30 ml |
|-------------|-------------|--------------|--------------|
| TCM Hepas   | 8,0 ml      | 12,0ml       | 24,0ml       |
| SFB         | 2 ml        | 3,0ml        | 6,0ml        |

### 2. Solução SD1 (filtrar)

| Componentes | q.s.p. 10 ml | q.s.p. 20 ml | q.s.p. 30 ml |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| SP          | -            | -            | -            |
| MLD         | 10 ml        | 20 ml        | 30 ml        |
| CS          | 0,85575g     | 1,71150g     | 2,56725g     |

### 3. Solução SD2

| Componentes | q.s.p. 5 ml | q.s.p. 10 ml | q.s.p. 15 ml |
|-------------|-------------|--------------|--------------|
| SD1         | 3 ml        | 6 ml         | 9 ml         |
| MLD         | 2 ml        | 4 ml         | 6 ml         |

## 6. PROCEDIMENTO DE DESVITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*.

- ✓ Localizar embriões a serem desvitrificados e manter organizado em caixa de isopor contendo nitrogênio suficiente para realizar todo procedimento sem necessidade de reabastecimento durante as manipulações.
- ✓ Identificar todos os reagentes e materiais que serão utilizados durante os procedimentos (tubos, meios e placas etc);
- ✓ Manter as soluções a temperatura ambiente.
- ✓ Identificar primeira placa como SD1, e segunda placa como SD2 no fundo e na tampa.
- ✓ Adicionar 3mL de meio em cada placa, somente no momento em que for iniciar o procedimento para evitar alterações de pH.
- ✓ Manter fichar de identificação do procedimento sempre a vista.
- ✓ Localizar haste a ser desvitrificada sem expor a mesma fora do nitrogênio.
- ✓ Em caso de haste protegida, retirar capa de proteção inda dentro do nitrogênio. Verificar quantidade de embriões vitrificados na haste.
- ✓ Posicionar placa contendo 3ml de SD1 na lupa, retirar a tampa e manter foco da lupa definido em Zoom distante.
- ✓ Retirar rapidamente a haste do nitrogênio e descer a ponta contendo os embriões vitrificados na placa de SD1, em posição de faca.
- ✓ Iniciar contagem de tempo, sendo a permanência máxima nesse meio 60 segundos.
- ✓ Movimentar a ponta da haste dentro da placa, para retirar os embriões. Realizar esse procedimento visualizando os embriões na lupa para certificar a quantidade identificada na haste.
- ✓ Utilizando uma pipeta P10, movimentar os embriões em diferentes áreas da placa SD1 para retirar o meios MV2 durante os 60 segundos, em seguida pipetar os embriões e transferir para placa de SD2, abrindo tempo de 5 minutos.
- ✓ Movimentar os embriões em diferentes áreas da placa SD2 para retirar o meios SD1 durante os 60 segundos, em seguida posicionar os embriões no centro da placa.
- ✓ Aguardar tempo total de 5 minutos na placa de SD2, em seguida lavar os embriões em duas gotas de meio de transporte antes de envasar os mesmos.
- ✓ Envasar os embriões em meios de transporte aquecido a 38,0 °C. Identificar lacradores e fichas de procedimentos.
- ✓ Transportar embriões a campo a 38,0 °C, em tempo máximo de 4 horas desde o final da desvitrificação

