

# EFEITO DO ACASALAMENTO ENTRE A DOADORA E O TOURO (HOLANDÊS *VERSUS* GIR) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS<sup>1</sup>

ANA PAULA TOLEDO BARBOSA DA SILVA<sup>2</sup>, RAQUEL RODRIGUES COSTA MELLO<sup>2\*</sup>, JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA<sup>2</sup>, MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 22/07/14. Aceito para publicação em 10/02/15.

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Seropédica, RJ, Brasil.

\*Autor correspondente: raquelmello@ufrj.br

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da raça da doadora de oócitos e a raça do touro (Holandês *versus* Gir) sobre os parâmetros de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos comparando as médias de oócitos recuperados e aptos ao cultivo e as taxas de oócitos aptos ao cultivo, de clivagem e de blastocisto. Foram coletados dados referentes a 1000 sessões de aspiração folicular (OPU), sendo 500 em doadoras da raça Holandesa e 500 da raça Gir. Os dados foram analisados pelos testes t de Student não pareado e Qui-quadrado, com nível de significância de 5%. As médias e os desvios padrão de oócitos recuperados e aptos ao cultivo para as raças Holandesas e Gir foram, respectivamente, 15,1±13,0; 8,7±7,6; 15,5±11,9 e 9,1±7,9. As taxas de oócitos aptos para o cultivo foram de 57,7 e 58,5% para as raças Holandesa e Gir, respectivamente. Houve diferença significativa entre as raças com relação aos oócitos aptos ao cultivo ( $P<0,05$ ), não sendo observada diferença significativa em relação aos oócitos recuperados e às taxas de oócitos aptos para o cultivo ( $P>0,05$ ). Do mesmo modo, foi observado que a raça da doadora de oócitos e do touro influenciou as taxas de clivagem e de blastocisto ( $P<0,05$ ). Os resultados para as combinações (raça da doadora x raça do touro) Holandesa x Holandês (G1), Holandesa x Gir (G2), Gir x Holandês (G3) e Gir x Gir (G4) foram 65,7; 60,3; 59,6 e 56,5%, respectivamente, para as taxas de clivagem, sendo  $G1>G2$ ,  $G1>G3$ ,  $G1>G4$ ,  $G2=G3$ ,  $G2>G4$  e  $G3>G4$ . Do mesmo modo, os resultados foram 28,1; 33,3; 26,8 e 31,0%, respectivamente, para as taxas de blastocisto, sendo  $G1>G2$ ,  $G1=G3$ ,  $G1<G4$ ,  $G2<G3$ ,  $G2=G4$  e  $G3<G4$ . Portanto, pode-se concluir que a raça da doadora e do touro influencia os parâmetros de PIV, com um maior número de oócitos aptos ao cultivo na raça Gir.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*, oócitos, acasalamento.

## EFFECT OF MATING BETWEEN THE DONOR COW AND BULL (HOLSTEIN *VERSUS* GYR) ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the effect of the breed of the oocyte donor cow and bull (Holstein versus Gyr) on *in vitro* production (IVP) parameters of bovine embryos comparing the mean number of recovered oocytes and oocytes suitable for culture, the rate of suitable oocytes, and cleavage and blastocyst rates. Data from 1,000 follicular aspiration sessions (OPU), including 500 in donor cows of the Holstein breed and 500 of the Gyr breed, were collected. The results were analyzed by the unpaired Student t-test and chi-square test, adopting a level of significance of 5%. The mean number and standard deviation of recovered oocytes and oocytes suitable for culture were 15.1±13.0 and 8.7±7.6 for the Holstein breed and 15.5±11.9 and 9.1±7.9 for the Gyr breed. The rates of suitable oocytes were 57.7% and 58.5% for Holstein and Gyr breeds, respectively. A significant difference between breeds was observed for the number of oocytes suitable for culture ( $P<0.05$ ), but not for the number of recovered oocytes or rates of suitable oocytes ( $P>0.05$ ). Similarly, the breed of the oocyte donor cow and bull influenced cleavage and blastocyst rates ( $P<0.05$ ). The cleavage rates were 65.7, 60.3, 59.6 and 56.5% for the combinations

(donor breed x bull breed) Holstein x Holstein (G1), Holstein x Gyr (G2), Gyr x Holstein (G3) and Gyr x Gyr (G4), respectively, with  $G1 > G2$ ,  $G1 > G3$ ,  $G1 > G4$ ,  $G2 = G3$ ,  $G2 > G4$ , and  $G3 > G4$ . The blastocyst rates were 28.1, 33.3, 26.8 and 31.0%, respectively, with  $G1 > G2$ ,  $G1 = G3$ ,  $G1 < G4$ ,  $G2 < G3$ ,  $G2 = G4$ , and  $G3 < G4$ . It can be concluded that the breed of the donor cow and bull influenced IVP parameters, with a larger number of oocytes suitable for culture in the Gyr breed.

Keywords: in vitro fertilization, mating, oocytes.

## INTRODUÇÃO

A produção de embriões *in vitro* (PIV) é uma técnica que vem se estabelecendo em todo o mundo, principalmente no Brasil. Há uma grande quantidade de laboratórios que oferecem essa biotécnica, a qual se tornou bastante acessível aos criadores de bovinos (ARRUDA *et al.*, 2012). O avanço da técnica de PIV viabiliza a utilização de animais bastante jovens diminuindo o intervalo de gerações, permitindo selecionar matrizes potenciais, produzindo novilhas de reposição apenas de animais geneticamente superiores, acelerando o melhoramento genético (MOCE *et al.*, 2006). Ainda, o uso de sêmen sexado permite aumentar o impacto na eficiência reprodutiva e produzir um número desejado de machos e fêmeas de acordo com o interesse dos produtores (RATH e JONHSON, 2008).

A utilização de cruzamentos *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* tem resultado na produção de animais F1 com satisfatório desempenho produtivo e reprodutivo, tanto em sistemas com alto ou baixo nível tecnológico de manejo. Sendo assim, a utilização de biotécnicas como a PIV é uma alternativa a ser considerada para a multiplicação desses animais. Os cruzamentos nos quais a raça materna é a Holandesa e a paterna é a zebu, como por exemplo, a Gir, pode ser uma alternativa para produção de mestiços F1 (RUAS *et al.*, 2010; ALVES, 2008).

No entanto, existem particularidades reprodutivas entre as fêmeas pertencentes aos grupos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* que podem influenciar os resultados dos programas de PIV em bovinos. Raças *Bos taurus indicus* são consideradas diferentes de *Bos taurus taurus* em relação ao número de ondas de crescimento folicular, número de folículos recrutados por onda, taxa de crescimento folicular e de ovulação e diâmetro máximo do folículo dominante e ovulatório (VIANA *et al.*, 2004; BARUSELLI *et al.*, 2007; PONTES *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2010; GRÁZIA *et al.*, 2012). Portanto, estas duas raças têm diferentes aspectos relacionados à fisiologia folicular e oocitária, indicando que podem ter diferentes respostas quando submetidas aos procedimentos da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU)-PIV.

De acordo com alguns autores, fêmeas *Bos taurus indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular e possuem maior população de folículos menores que 5 mm em comparação às fêmeas *Bos taurus taurus* (Bó *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2009). Bó *et al.* (2003) e GRÁZIA *et al.* (2012) sugeriram que a maior população de folículos que emergem em cada onda de crescimento folicular em *Bos taurus indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, que mesmo na presença de baixos níveis de FSH, pode promover maior mobilização e crescimento folicular nestes animais. Esta característica tem influência direta na eficiência da técnica de (OPU)-PIV, indicando vantagem na utilização de fêmeas zebuínas em relação às taurinas nos programas de PIV.

Desse modo, tem sido observada grande variação na eficiência da coleta dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) e subsequente produção de embriões *in vitro* entre os diferentes genótipos e raças de bovinos (LOPES *et al.*, 2006; BARUSELLI *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2008). Algumas diferenças relatadas entre as raças foram associadas ao número e qualidade dos CCOs recuperados por sessão de aspiração, sendo que fêmeas zebuínas podem ter maior número de folículos e maior número de oócitos recuperados, e, conseqüentemente, maior número de CCOs aptos ao cultivo para passarem pelas etapas de maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro* (PONTES *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2010; RATTO *et al.*, 2011; SATRAPA *et al.*, 2011).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do acasalamento entre a doadora de oócito e o touro utilizando as raças Holandesa e Gir submetidos à PIV para a obtenção de mestiços F1.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido utilizando-se dados fornecidos por uma Central de Reprodução Assistida de Bovinos (Laboratório *In Vitro* - Rio) localizada na fazenda Boa Vista em Barra do Piraí, RJ, entre agosto de 2010 e agosto de 2011.

Foram utilizados dados referentes a fêmeas

bovinas adultas doadoras de oócitos das raças Holandesa e Gir, com idade variando entre dois e sete anos, procedentes de diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro e de Minas Gerais. Os animais foram mantidos sob diferentes condições de manejo de acordo com a rotina estabelecida em cada propriedade. As aspirações foliculares foram realizadas na fazenda de origem dos animais, sendo que as doadoras não foram submetidas a algum tipo de estímulo hormonal antes das aspirações foliculares. Foram utilizados apenas animais livres de problemas reprodutivos, e sem alguma anomalia genital, os quais passaram por uma avaliação ginecológica prévia. Apenas foram aspiradas doadoras com escore de condição corporal entre 3,0 e 4,0 (escala variando de 1,0 a 5,0; FERREIRA, 2010).

Para realização da punção folicular, foi utilizada agulha hipodérmica descartável, conectada a um tubo cônico de 50 ml e acoplada a uma bomba a vácuo, com pressão ajustada para 68 mmHg. O líquido folicular contendo os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foi recolhido no tubo coletor contendo solução de PBS com heparina, mantida a 37°C. Após a aspiração, o conteúdo de cada tubo foi despejado em filtro para colheita de embriões e lavado com solução fisiológica acrescida de 1% de Soro Fetal Bovino, sendo vertido em placa de Petri para realização da procura, manipulação, lavagem e avaliação morfológica dos CCOs.

Os CCOs recuperados foram avaliados segundo LEIBFRIED e FIRST (1979), levando-se em consideração as características das células da granulosa e do citoplasma do oócito. Foram considerados aptos para o cultivo *in vitro* apenas CCOs classificados como graus I, II e III, enquanto os demais CCOs (desnudos, *cumulus* expandidos, atrésicos ou degenerados) foram descartados. Os oócitos grau I são aqueles considerados bons, pois possuem várias camadas de células da granulosa, células compactas (sem células extrusas) e citoplasma homogêneo. Os oócitos grau II são aqueles médios, com poucas camadas de células, algumas células extrusas e citoplasma não homogêneo. Os oócitos grau III são aqueles considerados ruins, com poucas ou somente uma camada de células, muitas células extrusas e citoplasma bastante pigmentado (GONÇALVES *et al.*, 2008). Após esta etapa, os CCOs passaram pelas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* e, no oitavo dia a taxa de produção embrionária foi determinada.

Para a maturação, o meio utilizado foi o de cultivo tecidual 199 (TCM 199), suplementado com soro fetal bovino, FSH, LH, piruvato e antibióticos, em período de 24 horas em atmosfera controlada

contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Após a maturação, os CCOs foram fecundados em meio Fert-Talp, por período de 18 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada, utilizando-se a concentração final de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/mL. Posteriormente, os CCOs foram cultivados em meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF) acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais, como a glutamina, em substituição à albumina ou ao soro fetal bovino, por 7 a 9 dias, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada, contendo 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada.

Foram coletados dados referentes a 1000 sessões de OPU, sendo que as aspirações foliculares foram separadas por grupo de raça da doadora (Holandesa, n=500 e Gir, n=500) e por cruzamento, sendo Grupo 1: doadora Holandesa com sêmen de touro Holandês (n=250), Grupo 2: doadora Holandesa com sêmen de touro Gir (n=250), Grupo 3: doadora Gir com sêmen de touro Holandês (n=250), e Grupo 4: doadora Gir com sêmen de touro Gir (n=250). As amostras totais, calculadas em mais de 2000 OPU, foram filtradas até contabilizarem as primeiras 250 OPU de cada acasalamento através do programa computacional Microsoft Excel 2013, formando o banco de dados com 4 acasalamentos de 250 cada.

Foram analisadas cinco variáveis: número de oócitos recuperados, número de oócitos aptos ao cultivo, taxa de oócitos aptos ao cultivo (CCO cultivados/CCO aspirados), taxa de clivagem (embriões clivados/oócitos viáveis) e taxa de blastocisto (blastocisto/oócitos viáveis). Foi analisado também o efeito do touro nas taxas de clivagem e de blastocisto. Para tanto, foi utilizado sêmen sexado de 5 touros da raça Holandesa e sexado de 5 touros da raça Gir para a obtenção de fêmeas. Não foi levado em consideração nesse estudo se houve variação entre touros e partidas, sendo verificado apenas o efeito do touro sobre os parâmetros de produção *in vitro*.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa computacional SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). As variáveis oócitos recuperados e aptos ao cultivo foram avaliadas por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t de Student não pareado. Para a análise das taxas de oócitos aptos ao cultivo, de clivagem e de blastocisto, foi usado o teste Qui-quadrado. A significância foi declarada quando P<0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e os respectivos desvios padrão de

oócitos recuperados, de oócitos aptos ao cultivo e a taxa de oócitos aptos para o cultivo de acordo com a raça da doadora estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença estatística do número de oócitos recuperados entre as duas raças (15,14±13,0 e 15,5±11,9 para as raças Holandesa e Gir, respectivamente,  $P>0,05$ ). No entanto, a raça Gir produziu número médio de oócitos aptos ao cultivo significativamente maior do que a raça Holandesa (8,7±7,6 e 9,12±7,9 para as raças Holandesa e Gir, respectivamente,  $P<0,05$ ). Em relação à viabilidade das estruturas recuperadas, as taxas de oócitos aptos para o cultivo para as raças Holandesas e Gir foram 57,73% e 58,57%, respectivamente, não havendo diferença estatística entre elas ( $P>0,05$ ).

**Tabela 1. Número total de sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) por doadora, número total e média de oócitos recuperados e viáveis por doadora**

	Holandesa	Gir
Número total de OPU/doadora	500	500
Número total de oócitos recuperados por doadora	7567	7775
Número total de oócitos viáveis por doadora	4366	4557
Média ± DP de oócitos recuperados por doadora	15,14 ± 13,08 a	15,57 ± 11,9 a
Média ± DP de oócitos viáveis por doadora	8,74 ± 7,67 a	9,12 ± 7,97 b
Taxa de aproveitamento de oócitos (%)	57,73 a	58,57 a

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

PONTES *et al.* (2010) e GRÁZIA *et al.* (2012), ao utilizarem doadoras oriundas de fazendas comerciais, observaram maior média de oócitos recuperados e aptos ao cultivo em doadoras da raça Gir quando comparada com doadoras da raça Holandesa. De fato, segundo BARUSELLI *et al.* (2007), os animais *Bos taurus indicus* apresentam naturalmente maior número de folículos disponíveis nos ovários para serem aspirados. Considerando-se uma melhor eficiência na coleta de oócitos quando são aspirados

pequenos folículos, há maior probabilidade de encontrar pequenos folículos em animais com três ondas foliculares quando comparados com duas ondas (SENEDA *et al.*, 2011).

No entanto, além do grupo genético em questão, a quantidade de oócitos recuperados e aptos ao cultivo pode apresentar variação em decorrência de diferentes condições experimentais de manejo e alimentação a que são submetidos os animais, o que pode ter ocorrido no presente estudo. Além disso, também deve ser levado em consideração a seleção das doadoras, pois cada propriedade escolhia as melhores matrizes de acordo com a produção de leite, havendo maior pressão de seleção das doadoras Holandesas para os programas de OPU-PIV pela maior produção de leite. Quando essas doadoras produziam boa quantidade de leite e respondiam bem à aspiração folicular, eram selecionadas. Ao contrário, quando não respondiam à aspiração, eram submetidas a melhor manejo nutricional, e em caso de não responderem à aspiração folicular, eram descartadas.

A raça Nelore, que também é uma raça pertencente ao grupo genético *Bos taurus indicus*, demonstra grande diferença em relação à média do número de oócitos recuperados em relação à raça Gir. WATANABE *et al.* (1999) e PONTES *et al.* (2011) relataram, respectivamente, média de 30,84±0,8 e 18,00±4,9 oócitos recuperados por doadora da raça Nelore. Por outro lado, VIANA *et al.* (2010) e CARVALHO *et al.* (2013) observaram, respectivamente, média de 7,00±0,1 e 6,70±6,1 oócitos recuperados por doadora para a raça Gir, semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho para esta raça. No entanto, essas diferenças, mesmo dentro do mesmo grupo genético, podem ser atribuídas a diversos fatores, tais quais relacionados ao próprio rebanho em estudo, incluindo condições fisiológicas dos animais, procedimentos de aspiração folicular, manejo alimentar e nutricional e clima. De modo geral, vacas zebuínas apresentam maior número de folículos nos ovários em comparação a vacas taurinas, estas últimas variando de 18 a 25 oócitos por sessão de OPU (WATANABE *et al.*, 1999; VIANA *et al.*, 2010; PONTES *et al.*, 2011).

No presente estudo, a média de oócitos aptos ao cultivo obtidos através das aspirações por OPU foi diferente entre as raças Holandesa e Gir. Estes resultados corroboram com outros na literatura, como PONTES *et al.* (2010) e GRÁZIA *et al.* (2012), que ao compararem a média de oócitos aptos ao cultivo por sessão de OPU por doadora das raças Gir e Holandesa, também verificaram que doadoras da raça Gir produziram maior número de oócitos aptos

ao cultivo em relação a raça Holandesa. De fato, PONTES *et al.* (2010) argumentaram que fêmeas *Bos taurus indicus* podem ter maior número de células germinativas no estágio fetal ou provavelmente um longo período de mitose durante a formação das oogônias, o que pode ser considerado um fator para maior produção de oócitos viáveis na raça Gir, como foi observado nos resultados deste estudo.

A taxa de oócitos aptos para o cultivo encontrada neste estudo não diferiu entre os grupos genéticos, talvez devido à semelhança na média de oócitos recuperados observada, contrariando alguns trabalhos recentes da literatura. RATTO *et al.* (2011) verificaram que a taxa de oócitos aptos para o cultivo e a proporção dos CCOs submetidos à maturação *in vitro* foram maiores na raça Aberdeen do que na raça Holandesa, sendo que esses resultados podem estar associados ao potencial genético da raça para a produção de CCOs aptos ao cultivo e embriões. No entanto, as condições de manejo e a produção de leite também são fatores que podem afetar a eficiência da PIV, levando à variação na taxa de oócitos aptos para o cultivo, como foi observado no presente estudo.

Da mesma forma, alguns autores relataram que a qualidade e a competência dos CCOs não são influenciadas pelo estado fisiológico da vaca doadora, e sim por fatores relacionados à eficiência da coleta dos CCOs e produção de embriões, sugerindo alta variação entre raças (TAMASSIA *et al.*, 2003; RATTO *et al.*, 2011). Além disso, a variação na produção de oócitos pode também estar relacionada ao manejo da técnica da OPU (PONTES *et al.*, 2010). Nesse sentido, verificou-se excelente número de oócitos recuperados e aptos ao cultivo em ambas as raças no presente estudo, provavelmente devido à experiência dos técnicos responsáveis pelas sessões de OPU, explicando a baixa variação na taxa de oócitos aptos para o cultivo.

As taxas de clivagem (embriões clivados/oócitos cultivados) e de blastocisto (embriões no estágio de blastocisto/oócitos cultivados) de acordo com a raça da doadora, usando sêmen sexado para obtenção de fêmea de touro Holandês e Gir para ambas as raças, estão apresentadas na Tabela 2. Foi observado que a raça da doadora de oócitos e do touro influenciou as taxas de clivagem e de blastocisto ( $P>0,05$ ). Os resultados para as combinações (raça da doadora x raça do touro) Holandesa x Holandês (G1), Holandesa x Gir (G2), Gir x Holandês (G3) e Gir x Gir (G4) foram 65,79; 60,36; 59,67 e 56,54%, respectivamente, para as taxas de clivagem, sendo  $G1>G2$ ,  $G1>G3$ ,  $G1>G4$ ,  $G2=G3$ ,  $G2>G4$  e  $G3>G4$ . Do mesmo modo, os resultados

foram 28,18; 33,34; 26,82 e 31,09%, respectivamente, para as taxas de blastocisto, sendo  $G1>G2$ ,  $G1=G3$ ,  $G1<G4$ ,  $G2<G3$ ,  $G2=G4$  e  $G3<G4$ .

**Tabela 2. Taxa de clivagem (embriões clivados/oócitos viáveis) e de blastocisto (embriões no estágio de blastocisto/oócitos viáveis) de acordo com a raça da doadora, usando sêmen sexado para obtenção de fêmea de touro Holandês e Gir para ambas as raças**

Doadora	Touro	Taxa de clivagem (%)	Taxa de blastocisto (%)
(G1) Holandesa	Holandês	65,79 a	28,18 a
(G2) Holandesa	Gir	60,36 bc	33,34 b
(G3) Gir	Holandês	59,67 bc	26,82 ac
(G4) Gir	Gir	56,54 d	31,09 bd

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

Em estudo semelhante, GRÁZIA *et al.* (2012), ao compararem as taxas de clivagem (embriões no estágio de blastocisto/oócitos cultivados) de matrizes da raça Holandesa x touro Holandês (G1), Gir x Gir (G2), Holandesa x Gir (G3) e Gir x Holandês (G4), observaram diferenças entre as combinações raça da doadora de oócitos x raça do touro. Os autores relataram que as taxas de clivagem em G2 e G4 foram semelhantes (86,6 e 87,2%;  $P>0,05$ ) e superiores ao G1 (82,8%;  $P<0,05$ ), que por sua vez foi superior ao G3 (61,3%;  $P<0,05$ ), observando maior qualidade e potencial de desenvolvimento *in vitro* de oócitos na raça Gir, independente da raça do touro. No entanto, no presente trabalho, as combinações com a matriz Holandesa tiveram as maiores taxas de clivagem (Tabela 2), o que pode ter ocorrido pelos diferentes tipos de manejo a alimentação a que foram submetidas as doadoras de cada raça, pois as da raça Gir foram criadas a pasto, e as da raça Holandesa foram criadas confinadas ou semiconfinadas e, portanto, com melhor controle no manejo.

Do mesmo modo, NABHAN *et al.* (2012), ao avaliarem a produção *in vitro* de embriões em diferentes combinações raça da doadora de oócitos x raça do touro [Nelore x Nelore (G1), Holandês x Nelore (G2), Holandês x Angus (G3), Holandês x Brahman (G4) e Holandês x Gir (G5)], observaram que nos embriões Holandês x Gir a taxa de clivagem foi inferior à das demais combinações

estudadas, sendo que a combinação Nelore x Nelore proporcionou os melhores resultados (79,0; 74,3; 71,7; 74,8 e 57,8%, respectivamente, sendo  $G1=G2$ ,  $G1>G3$ ,  $G1>G4$ ,  $G1>G5$ ,  $G2=G3$ ,  $G2=G4$ ,  $G2>G5$ ,  $G3=G4$ ,  $G3>G4$  e  $G4>G5$ ;  $P<0,05$ ). No presente estudo, a combinação Holandesa x Gir proporcionou os melhores resultados (28,18; 33,34; 26,82 e 31,09%, respectivamente, sendo  $G1>G2$ ,  $G1=G3$ ,  $G1>G4$ ,  $G2>G3$ ,  $G2=G4$  e  $G3>G4$ ;  $P<0,05$ ).

De fato, Xu *et al.* (2006) já descreveram a eficiência do uso do sêmen sexado para se produzir embriões *in vitro* em doadoras Holandesas, com, aparentemente, maiores taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. No entanto, esses autores usaram sêmen sexado somente de um único touro Holandês selecionado. No presente estudo, apesar de não ter sido avaliada as taxas de clivagem e de blastocisto de touros individuais, foram utilizados 5 diferentes touros de cada raças e não somente um touro, o que pode ter influenciado os resultados, pois sabe-se que há grande variação individual entre touros. No entanto, PALMA e SINOWATZ (2004), ao utilizarem sêmen de 63 touros diferentes da raça Simental na PIV, não observaram diferença entre a taxa de clivagem quando compararam o efeito do touro. Desse modo, os estudos da PIV relacionados ao efeito da raça, tanto da doadora quanto do touro, ainda precisam ser mais elucidados, sendo que muitos destes estudos ainda são recentes e estão sujeitos a variações que ocorrem entre os laboratórios, técnicos e manejo.

Com relação à taxa de blastocisto, também foram observadas no presente estudo diferenças estatísticas entre as combinações, sendo que a combinação Holandesa x Gir apresentou a melhor taxa (33,34%;  $P<0,05$ ), ressaltando a influência da doadora de oócitos na produção *in vitro* de embriões. TAMASSIA *et al.* (2003), avaliando a influência da raça da doadora na produção de oócitos e formação de blastocistos *in vitro* utilizando repetidas sessões de OPU na raça Holandesa, observaram média de 28,8%, com significativa variação entre os animais ( $P<0,05$ ), verificando que a maior e a menor produção de blastocisto eram sempre dos mesmos animais, independente do sêmen utilizado, revelando a influência materna no desenvolvimento de embriões bovinos.

Alguns estudos sugerem que as taxas de clivagem e de blastocisto de fêmeas *Bos taurus taurus* são comparáveis às taxas obtidas com fêmeas *Bos taurus indicus* com divergências de resultados, estando mais provavelmente relacionadas à qualidade oocitária do que ao fator racial (TAMASSIA *et al.*, 2003; PONTES *et al.*, 2010; ZAGO, 2011). Sabe-se que o manejo

e a alimentação dos animais são fatores que podem ter influenciado os resultados da PIV e as variações observadas nesse estudo, já que as doadoras eram procedentes de diferentes propriedades e estados brasileiros, ou seja, submetidas a diferentes condições de manejo e clima. Possivelmente, em determinadas fazendas, com melhor manejo, as fêmeas apresentaram melhor resposta. De qualquer forma, a influência materna e paterna na produção de oócitos e de embriões bovinos *in vitro* ainda permanece indeterminada e necessita de mais estudos.

## CONCLUSÃO

A raça da doadora não interfere no número de oócitos recuperados, bem como na taxa de oócitos aptos para o cultivo. A raça da doadora e do touro influencia as taxas de clivagem e de blastocisto na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. O uso do cruzamento doadora Holandesa com touro Gir é o mais eficiente para a PIV de embriões mestiços F1.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa *In vitro* Rio, pela concessão dos dados e o suporte à infraestrutura para este estudo.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, B.R.C. **Produção *in vivo* e transferência de embriões F1 em rebanhos leiteiros, utilizando-se cruzamento recíproco entre as raças Holandês e Gir em duas épocas do ano.** 2008. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2008.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, S.A.F.; AFFONSO, J.F. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction**, v.9, p.345-353, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.205-211, 2007.

- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.
- CARVALHO, B.C.; VARAGO, F.C.; RUAS, J.R.M.; VARGAS, M.W.; SANTOS, G.B.; SILVA, A.M. Produção de embriões em vacas zebuínas após superovulação com duas formulações comerciais de gonadotrofina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, p.155-159, 2013.
- CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-175, 2008.
- FERREIRA, A.M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. Juiz de Fora, MG: Editora Associada, 2010. 422p.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 395p.
- GRÁZIA, J.G.V.; GHETTI, A.M.; PAIM, C.A.S.; ARASHIRO, E.K.N.; CAMARGO, L.S.A.; GARCIA, R.M.G.; VIANA, J.H.M. Associação da concentração de IGF plasmático e produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Gir. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 26., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais....Foz do Iguaçu: SBTE**, 2012a. p.404.
- GRÁZIA, J.G.V.; TAVARES, L.L.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M. Eficiência na produção *in vitro* de embriões mestiços F1 utilizando-se doadoras das raças Gir (*Bos taurus indicus*) ou Holandesa (*Bos taurus taurus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 26., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais....Foz do Iguaçu: SBTE**, 2012b. p.405.
- HIRATA, T.I.; SATO, M.; SASAKI, A.I.; SASAKI, O.; OSAWA, T. Effect of suckling on embryo production by repeated ovum pick-up before and after timed artificial insemination in early postpartum Japanese black cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, p.351-364, 2008.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.48, p.76-86, 1979.
- LOPES, A.S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of Days Post-Partum, Breed and Ovum Pick-Up Scheme on Bovine Oocyte Recovery and Embryo Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.196-203, 2006.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v.66, p.929-936, 2006.
- NABHAN, T.; SATRAPA, R.A.; SIMÕES, R.A.L.; SILVA, C.F.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, p.332-335, 2011.
- PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomy, Histology, Embryology**, v.33, p.257-262, 2004.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nellore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JÚNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JÚNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryos yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nellore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCINATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIBER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.
- RATH, D.; JOHNSON, L.A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.338-346, 2008.
- RATTO, M.H.; PERALTA, O.A.; MOGOLLON, G.; STROBEL, P.; CORREA, J. Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.1-6, 2011.
- RUAS, J.R.M.; MENEZES, A.C.; CARVALHO, B.C.; QUEIROZ, D.S.; SILVA, E.A.; FERREIRA, J.J. Sistema de produção de leite com vacas F1 Holandês x Zebu. **Informe Agropecuário**, v.31, p.63-71, 2010.
- SATRAPA, R.A.; NABHAN, T.; SILVA, C.F.; SIMÕES, R.A.L.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of sire breed (*Bos*

- indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.76, p.1162-1167, 2011.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.
- TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, J.P.; MAILLARD, S.C. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.629-637, 2003.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; FERNANDES, 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 Gyr breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1-12, 2004.
- VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA, J.F. CAMARGO, L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v.73, p.966-972, 2010.
- WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.438, 1999. Abstract.
- XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNÝES, J.F.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2510-2518, 2006.
- ZAGO, F.C. **Eficiência de sistemas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos da Raça Flamengo**. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina (UESC), Lages, SC, 2011.