

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Gabriel do Nascimento Moulin

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE SANGUE DE DOADORAS GIROLANDO NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

ALEGRE, ES

2021

GABRIEL DO NASCIMENTO MOULIN

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE SANGUE DE DOADORAS GIROLANDO NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro De Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.
Orientador: Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto.

ALEGRE

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M926i Moulin, Gabriel do Nascimento, 1994-
Influência do grau de sangue de doadoras Girolando na produção in vitro de embriões / Gabriel do Nascimento Moulin. - 2021.
47 f. : il.

Orientador: José de Oliveira Carvalho Neto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Bovinos. 2. Cruzamentos. 3. Girolando. 4. Ovócitos. 5. Embriões. I. Carvalho Neto, José de Oliveira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

GABRIEL DO NASCIMENTO MOULIN

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE SANGUE DE DOADORAS GIROLANDO NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovado em 01 de março de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Dra. Michele Ricieri Bastos
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Ítalo Câmara de Almeida
Universidade Federal do Espírito Santo

À minha família, pelo apoio e amor por mim.
Serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por te me dado saúde, coragem e sabedoria para vencer as dificuldades que surgiram.

Em especial aos meus pais, Carlos Luciano Moulin e Ruth do Nascimento Moulin, e a minha irmã Ester do Nascimento Moulin, pelo apoio, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. José de Oliveira Carvalho Neto, pela amizade, confiança, compreensão e pelos conhecimentos passados ao longo destes dois anos.

À professora, Dra. Maria Aparecida da Siva pela colaboração no início do mestrado.

Ao Emanuel Dallastra pelo companherismo, confiança e apoio.

À Izabelle Pereira pela orientação, apoio e suporte.

À empresa Embriopec pelo fornecimento dos dados.

Aos amigos da pós-graduação, Alana Camargo, Hugo Nascimento, Marcos Vinicius, Eduardo Vargas, por compartilharem as dificuldades e os bons momentos vividos durante os dois anos de mestrado.

E por fim a Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr,
ande. Se não puder andar, rasteje, mas
continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

MOULIN, GABRIEL DO NASCIMENTO. **Influência do grau de sangue de doadoras Girolando na produção *in vitro* de embriões**. 2021.47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

O cruzamento entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, especialmente entre as raças Holandesa x Gir, são amplamente utilizados no Brasil. Entretanto, são limitadas as informações referentes ao uso de animais Girolando em um programa de produção *in vitro* de embriões (PIVE). O objetivo deste estudo foi avaliar resultados da produção *in vitro* de embriões de doadoras Girolando $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês - $\frac{1}{4}$ Gir), bem como analisar a influência do número de ovócitos recuperados, do touro utilizado e a estação do ano sobre os índices da PIVE. Doadoras $\frac{1}{2}$ apresentaram maior produção de ovócitos viáveis ($19,7 \pm 0,6$) e totais ($28,0 \pm 0,8$) em relação a doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir) com $11,3 \pm 1,0$ ovócitos viáveis e $17,6 \pm 1,4$ totais. Doadoras $\frac{1}{2}$ foram mais eficientes com $4,8 \pm 0,2$ embriões produzidos em relação as doadoras $\frac{1}{4}$ ($2,6 \pm 0,3$) e $\frac{3}{4}$ ($1,6 \pm 0,3$). Maior número de prenhez ($1,8 \pm 0,1$) foi encontrado nas doadoras $\frac{1}{2}$ em relação a doadoras $\frac{3}{4}$ ($0,6 \pm 0,2$). Com relação ao número de ovócitos recuperados, doadoras classificadas no grupo de alta produção de ovócitos apresentaram maior quantidade ($28 \pm 3,0$) e porcentagem ($72,4\%$) de ovócitos viáveis em relação a doadoras de baixa produção ($13,3 \pm 0,8$; $68,9\%$), assim como maior quantidade de embriões produzidos ($71,1 \pm 1,6$ vs. $5,1 \pm 0,4$). Na estação da primavera foi observada maior porcentagem de ovócitos em relação ao inverno (75% vs. $69,3\%$). Em relação à influência do touro na taxa de embrião e prenhez, foram encontradas variações entre $9,5$ e $34,8\%$ na taxa de embrião, sem que houvesse influência na taxa de prenhez. Conclui-se que doadoras $\frac{1}{2}$ possuem maior eficiência na produção de embriões do que doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês – $\frac{1}{4}$ Gir). O inverno influenciou negativamente na porcentagem de ovócitos recuperados, e o touro apresenta influência na porcentagem de embriões produzidos.

Palavras- chave: Cruzamentos. Bovinos. PIVE.

ABSTRACT

MOULIN, GABRIEL DO NASCIMENTO. **Influence of the blood grade of Girolando donors on *in vitro* embryo production.** 2021. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

The crossing between *Bos taurus* and *Bos indicus*, especially between the Holstein x Gir breeds, are widely used in Brazil. However, information regarding the use of Girolando animals in an *in vitro* embryo production program (PIVE) is limited. The aim of this study was to evaluate the results of *in vitro* embryo production from donors Girolando $\frac{1}{4}$ (1/4 Holstein - $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holstein - $\frac{1}{2}$ Gir) and $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holstein - $\frac{1}{4}$ Gir) donors, as well as analyzing the influence of the number of oocytes recovered, of the bull and the season on the PIVE indexes. Donors $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holstein - $\frac{1}{2}$ Gir) showed higher production of viable (19.7 ± 0.6) and total (28.0 ± 0.8) oocytes compared to $\frac{1}{4}$ (1/4 Holstein - $\frac{3}{4}$ Gir) oocytes 11.3 ± 1.0 viable and total 17.6 ± 1.4 . Donors $\frac{1}{2}$ were more efficient with 4.8 ± 0.2 produced compared to donors $\frac{1}{4}$ (2.6 ± 0.3) and $\frac{3}{4}$ (1.6 ± 0.3). Highest number of pregnancies (1.8 ± 0.1) was found in donors $\frac{1}{2}$ in relation to donors $\frac{3}{4}$ (0.6 ± 0.2). Regarding the number of oocytes recovered, donors classified in the group of high oocyte production had a higher amount (28 ± 3.0) and a percentage (72.4%) of viable oocytes compared to low production donors (13.3 ± 0.8 ; 68.9%), as well as a larger number of embryos produced (71.1 ± 1.6 vs. 5.1 ± 0.4). In the spring season, a higher percentage of oocytes was observed compared to winter (75% vs. 69,3%). Regarding the influence of the bull on the embryo and pregnancy rate, variations between 9.5 and 34.8% were found in the embryo rate, with no influence on the pregnancy rate. It is concluded that $\frac{1}{2}$ donors are more efficient in embryo production than donors $\frac{1}{4}$ (1/4 Holstein - $\frac{3}{4}$ Gir), and $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Hostein - $\frac{1}{4}$ Gir). The winter negatively influences the percentage of oocytes recovered, and the bull has an influence on the percentage of embryos produced.

Key-words: Crossings. Cattle. PIVE.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir), e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês – $\frac{1}{4}$ Gir).....	26
Tabela 2 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês de baixa (<25 ovócitos totais), média (25-30 ovócitos totais) e alta (>30 ovócitos totais) quantidade de ovócitos coletados no momento das aspirações foliculares guiadas por ultrassonografia (OPU)	27
Tabela 3 - Porcentagem de embriões de acordo com oestágio de desenvolvimento embrionário em D7 de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês de baixa (<25 ovócitos totais), média (25-30 ovócitos totais) e alta (>30 ovócitos totais) quantidade de ovócitos totais coletados no momento da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)	28
Tabela 4 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês de acordo com a estação do ano	28
Tabela 5 - Estágio de desenvolvimento embrionário e porcentagem de embrião em D7 e taxa de prenhez aos 60 dias de acordo com o touro utilizado	31

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões no Brasil	13
2.2 Importância do Girolando no Brasil	14
2.3 Cruzamentos raciais	15
2.4 Diferenças fisiológicas entre <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Aspiração folicular e seleção ovocitária	20
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	21
3.2.1 Maturação <i>in vitro</i>	21
3.2.2 Seleção espermática e fecundação <i>in vitro</i>	21
3.2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	21
3.3 Transferência de embriões e diagnóstico de gestação	22
3.4 Análise estatística	23
3.5 Experimento 1: Efeito da raça da doadora na taxa de recuperação de ovócitos, produção de embriões e prenhez	23
3.6 Experimento 2: Efeito da produção ovocitária no momento da OPU na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez	23
3.7 Experimento 3: Efeito da estação do ano na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez	24
3.8 Experimento 4: Efeito do touro na produção de embriões, prenhez e acurácia da sexagem	24
4 RESULTADOS	26
4.1 Experimento 1: Efeito da raça da doadora na taxa de recuperação de ovócitos, produção de embriões e prenhez	26
4.2 Experimento 2: Efeito da produção ovocitária no momento da OPU na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez	27
4.3 Experimento 3: Efeito da estação do ano na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez	28

4.4 Experimento 4: Efeito do touro na produção de embriões, prenhez e acurácia da sexagem	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	37
7 REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A demanda por animais geneticamente superiores, assim como produtos de origem animal de qualidade faz com que a busca por alternativas para aumentar a seleção genética nos rebanhos, seja constante. Para isto, podem ser utilizadas diferentes biotecnologias reprodutivas, entre elas a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Embora tenha sido aplicada inicialmente na pecuária de corte, o segmento do leite foi de grande relevância para estabelecimento da técnica no Brasil, principalmente com a associação do uso de sêmen sexado, permitindo direcionar o sexo dos descendentes.

O Brasil está entre os maiores produtores de leite do mundo, contribuindo significativamente para a economia do país. Entretanto, a produtividade por animal é baixa, sendo de aproximadamente 2,6 mil litros/vaca/ano (IBGE, 2017), colocando o país em 17^a posição no que diz respeito à produtividade. Uma das formas de aumentar este índice é o uso de animais geneticamente superiores em programas de melhoramento genético, associado ao uso de tecnologias de reprodução assistida. Neste sentido, a PIVE é uma importante biotecnologia para promover o melhoramento genético, com a multiplicação de fêmeas de alto mérito zootécnico.

Esta tecnologia é aplicada nas mais variadas raças de bovinos, sendo que as mais utilizadas no segmento leiteiro, são as raças Gir e Holandes, assim como o cruzamento entre as duas, dando origem a raça Girolando. No Brasil, os animais Girolando e suas variações de grau de sangue, são responsáveis por 80% da produção de leite (CANAZA-CAYO et al., 2014), conferindo a estes animais relevante importância nacional.

Os animais Girolandos são capazes de manter níveis satisfatórios de produção de leite, mesmo diante de variações de manejo e climáticas (BORGES et al., 2012). Portanto, a preferência no uso da raça Girolando em relação aos animais puros pode estar relacionada a sua maior rusticidade no que diz respeito à temperatura, ectoparasitas e demais situações adversas (ALVIM et al., 2005). Com isto, estes animais apresentam bons índices produtivos e reprodutivos em sistemas

com diferentes níveis tecnológicos (SILVA et al., 2015), característica importante devido a diversidade do sistema de produção de leite no Brasil.

Embora seja intenso o uso do Girolando no sistema de produção de leite no país, é limitado o número de trabalhos que avaliam seus índices reprodutivos na PIVE. Há relatos que animais $\frac{1}{2}$ Gir x Holandês apresentam maior quantidade de recuperação de ovócitos viáveis por sessão de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) em relação a doadoras puras Gir ou Holandesa (LACERDA et al., 2020; PONTES et al., 2010). Ainda no estudo de Pontes *et al.* (2010), foi identificado que doadoras $\frac{1}{4}$ apresentaram maior quantidade de ovócitos totais e viáveis em relação a doadoras $\frac{1}{2}$ sangue, Gir e Holandesa, além de possuir maior produção de embriões e prenhez do que doadoras Holandesas. Também é conhecido que doadoras Gir ou Holandês possuem variação em índices da PIVE de acordo com a estação do ano e número de ovócitos coletados no momento da OPU, sem resultados deste efeito em animais Girolando com diferentes graus de sangue. Além disto, não há relato na literatura avaliando os índices da PIVE para doadoras $\frac{3}{4}$ em relação á doadoras de diferentes graus de sangue provenientes do cruzamento entre as raças Gir e Holandes. Desta forma, são necessários mais estudos relacionados aos índices da PIVE em animais Girolando, assim como variações no cruzamento entres as raças Gir e Holandesa. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de doadoras Girolandas $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês - $\frac{1}{4}$ Gir) em índices da PIVE, como número de ovócitos totais e viáveis, produção de embriões e prenhez, assim como analisar a influência do número de ovócitos coletados sobre estes indices, e efeito do touro no desenvolvimento embrionário, produção de embriões, prenhez e acurácia da sexagem espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões no Brasil

A produção comercial de embriões bovinos produzidos *in vitro* no Brasil teve início no ano de 1998 (GALLI et al., 2003). A PIVE é uma biotecnologia eficiente para a produção de animais de alto mérito genético, sendo uma ferramenta importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre as gerações e acelerando o melhoramento genético animal (LOIOLA et al., 2014). No entanto, há ampla evidência que envolve aspectos, tanto morfológicos quanto moleculares relacionados aos ovócitos, que influenciam a eficiência da PIVE, observando diferenças na qualidade entre embriões produzidos *in vitro* em relação ao embrião *in vivo*. Estas diferenças são provavelmente devido a diferentes fatores, como raça, diferentes metodologias de maturação e cultivo *in vitro*, individualidade da doadora e do touro (CAMARGO et al., 2006; LOIOLA et al., 2014).

O efeito da raça da doadora na capacidade do ovócito em gerar embriões é conhecido (CAMARGO et al., 2006; FISCHER et al., 2000), sendo que animais *Bos indicus* apresentam melhores índices nos programas de produção *in vitro* de embriões como, maior produção ovócitos totais e viáveis, assim como melhor qualidade ovocitária e maior taxa de clivagem dos gametas (BECHER et al., 2018). O efeito da raça da doadora nos índices da PIVE torna-se mais evidente quando associado às variações das condições ambientais e nutricionais (CAMARGO et al., 2006; BECHER et al., 2018), uma vez que animais *Bos taurus* ou *Bos indicus*, apresentam diferentes respostas quando expostos as mesmas condições de criação (PONTES et al., 2011).

A estação do ano interfere na quantidade de complexos *cumulus-ovócitos* COCs totais recuperados por seção de aspiração folicular, sendo que o inverno influencia negativamente estes índices (LARCERDA, 2020). Isto ocorre principalmente devido à menor qualidade e menor disponibilidade de nutrientes na

pastagem na estação de seca/inverno (LARCERDA, 2020; LIU et al., 2018; PETERSON; SHEAFFER; HALL, 1992).

De fato, o fator nutricional está diretamente ligado ao desempenho reprodutivo de bovinos, afetando o metabolismo e a fisiologia reprodutiva dos animais, sendo que vacas que possuem melhor escore de condição corporal apresentam melhor desempenho reprodutivo (TORRES; TINEO; RAIDAN, 2015). A ingestão de nutrientes atua no eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, além de afetar fatores de crescimento que participam do controle da função ovariana e produção embrionária. Isto ocorre devido à atuação da nutrição no desenvolvimento folicular, através de mecanismos de sinalização metabólica e alteração no metabolismo de hormônios como progesterona e estradiol (ARMSTRONG et al., 2001; SANGSRITAVONG et al., 2002; SCARAMUZZI et al., 2006). Uma dieta de alta ingestão alimentar induz aumento do fluxo sanguíneo hepático, e conseqüentemente há um maior metabolismo e degradação de progesterona e estradiol, gerando redução na concentração circulante desses hormônios (PRATA, 2013).

2.2 Importância do Girolando no Brasil

Nas regiões tropicais os sistemas de produção de leite apresentam menores índices produtivos quando comparados as regiões temperadas, uma vez que altas temperaturas e alta umidade influenciam negativamente no conforto térmico das fêmeas bovinas, em especial para fêmeas holandesas leiteiras (NASCIMENTO et al., 2017). Estes animais possuem alta produtividade quando mantidos em condições de conforto térmico e boas condições nutricionais. Entretanto, para regiões de clima tropical, a produção de leite está estreitamente relacionada aos cruzamentos entre bovinos leiteiros *Bos taurus* e *Bos indicus* (SANTOS, 2015), gerando animais com boa produtividade e mais resistentes as variações de temperatura e fornecimento nutricional, do que animais holandeses puros.

Estes cruzamentos tiveram início no Brasil por volta das décadas de 1940 e 1950, período no qual os produtores de gado de leite começaram os cruzamentos entre animais das raças Gir e Holandesa, promovendo a integração da boa produtividade leiteira do gado Holandês e a rusticidade da raça Gir (CANAZA-CAYO

et al., 2014). O objetivo era promover a melhoria da produtividade dos sistemas de produção de leite, gerando animais com alta capacidade de produção e resistentes as condições tropicais e subtropicais do país (FACÓ et al., 2005). Atualmente, este cruzamento é amplamente conhecido como Girolando, representando 80% da produção de leite no país (CANAZA-CAYO et al., 2014).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente de 213,5 milhões de cabeças (IBGE, 2018), tem o terceiro maior rebanho de vacas leiteiras, composto de cerca de 15 milhões de animais, em sua maioria da raça Girolando, com seus diferentes graus de sangue (CANAZA-CAYO et al., 2014). A produção de leite em 2018 foi de 33,8 bilhões de litros, com incremento na produtividade média de leite em 4,7% em relação á 2017 (IBGE, 2018). Esse crescimento provavelmente está associado ao intenso trabalho de melhoramento genético dos animais, associado ao uso de tecnologias de reprodução assistida, acelerando os cruzamentos entre animais das raças Gir e Holandesa (DALTRO, 2018).

De fato, a produtividade de animais Girolando é superior a produtividade nacional, produzindo 5,2 mil litros/vaca/ano em relação á média nacional de 2,6 mil litros/vaca/ano. Isto demonstra a importância da raça para o desenvolvimento da pecuária leiteira no país (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE GIROLANDO, 2018; IBGE, 2017). Além disso, tem sido observada uma crescente comercialização de sêmen de touros Girolando no Brasil, chegando à marca de 579.438 doses produzidas no ano de 2017, o que representa 8% de crescimento em relação ao ano de 2016 (SILVA et al., 2019).

2.3 Cruzamentos raciais

Os cruzamentos são realizados com a finalidade de reunir em um só animal as características desejáveis de duas ou mais raças, assim como explorar a heterose e possibilitar a incorporação de material genético desejável de forma mais rápida (SANTOS, 2015). A heterose ou vigor híbrido é o fenômeno pelo qual os filhos apresentam melhor desempenho do que a média dos pais, e será tão mais

pronunciada quanto mais geneticamente diferentes forem as raças ou linhagens envolvidas no cruzamento (MIRANDA; FREITA, 2009).

O cruzamento mais comumente utilizado na pecuária de leite no Brasil é entre as raças Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*). Este cruzamento permite a incorporação de características da raça Gir, como rusticidade, capacidade de adaptação ao clima tropical, longevidade produtiva e reprodutiva, menor custo de manutenção e boa produção de leite a pasto, associada às características de precocidade sexual e alta produção da raça Holandesa, obtendo animais com maior capacidade produtiva (SANTOS, 2015).

Dependendo do grau de sangue dos animais a serem utilizados no cruzamento, podem ser formados animais com diferentes graus raciais. O cruzamento entre dois animais de raças puras irá gerar animais conhecido como F1. Desta forma, o nascimento de um produto do cruzamento entre uma fêmea Gir e um touro holandês, irá gerar um produto $\frac{1}{2}$ sangue (F1) Holandes-Gir. O cruzamento entre estas duas raças puras, e entre seus produtos, podem gerar animais com diferentes graus raciais, e por meio de diferentes cruzamentos foi originado a raça Girolando Puro Sintético, conforme mostra a figura 1.

Entre os grupos genéticos mais utilizados na raça Girolando estão animais $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês + $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{3}{8}$ ($\frac{3}{8}$ Holandês + $\frac{5}{8}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês + $\frac{1}{2}$ Gir), $\frac{5}{8}$ ($\frac{5}{8}$ Holandês + $\frac{3}{8}$ Gir), $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês + $\frac{1}{4}$ Gir) e $\frac{7}{8}$ ($\frac{7}{8}$ Holandês + $\frac{1}{8}$ Gir), sendo utilizado como padrão a fração da composição genética da raça Holandesa, primeiramente (LEITE, 2016).

Figura 1 - Diferentes cruzamentos entre as raças Gir e Holandesa originando a raça Girolando Puro Sintético.



FONTE: adaptado de Associação Brasileira de Criadores de Girolando (2020).

2.4 Diferenças fisiológicas entre *Bos taurus* e *Bos indicus* na produção *in vitro* de embriões

Existem particularidades reprodutivas entre fêmeas pertencentes as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* que podem interferir nos resultados dos programas de PIVE em bovinos. Animais *Bos indicus* são considerados diferentes de *Bos 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 (SILVA et al., 2015).

Animais *Bos indicus* apresentam maior número de ondas de crescimento folicular, em geral de 3 a 4 ondas e maior quantidade de folículos antrais em relação aos *Bos taurus*, que apresentam 2 a 3 ondas de crescimento folicular

(BALDRIGHI et al., 2012; BALDRIGHI et al., 2014; BORGES et al., 2004).

Animais *Bos taurus* apresentam maior tamanho de folículo dominante, com tamanho médio do folículo pré-ovulatório de 16 mm, e conseqüentemente, maior volume de Corpo Lúteo, enquanto que em animais *Bos indicus* o tamanho médio do folículo pré-ovulatório é de 12 mm (BALDRIGHI et al., 2012).

Embora poucos estudos avaliem a fisiologia reprodutiva de animais Girolando, foi relatada presença de 2 a 3 ondas de crescimento folicular nestes animais (BORGES et al., 2001; DEGEFA et al., 2016), com o diâmetro do folículo dominante de 13,3 mm em animais de duas ondas, e 11,8 mm em animais de três ondas (BORGES et al., 2001).

Em *Bos taurus*, o número de folículos visualizados no momento da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) varia entre 4,1 a 16,9, enquanto que em *Bos indicus*, são visualizados entre 6,8 a 19,5 folículos (GIMENES, 2010). Embora esta grande variação possa ocorrer entre animais da mesma raça, animais *Bos taurus* tendem a ter menor número de folículos recrutados do que *Bos indicus*. De fato, Grázia et al. (2012) e Lacerda et al. (2020) observaram maior média e qualidade de ovócitos recuperados em doadoras da raça Gir quando comparada com doadoras da raça Holandesa. Esse maior número de ovócitos recuperados pode ser justificado pelas fêmeas *Bos indicus* possuírem maior número de células germinativas no estágio fetal (PONTES et al., 2010), altas dosagens séricas do fator de crescimento hormônio antimulleriano (AMH), (BATISTA et al., 2014; GHANEM et al., 2016), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF I) (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003), hormônio do crescimento (GH) e glicose (ALVAREZ et al., 2000; SALES, et al., 2015), os quais estão envolvidos no recrutamento e crescimento folicular inicial, além da proliferação de células da granulosa e da teca (ALVAREZ et al., 2000; GUERREIRO et al., 2014; MONTEIRO et al., 2017).

Em relação a produção de embriões, Oliveira et al. (2019) observaram que ovócitos de vacas Gir foram mais competentes para a produção de embriões do que ovócitos provenientes de vacas Holandesas, com taxa de prenhez de 41% para doadoras Gir e 22,9% para doadoras Holandesas. Doadoras ½ possuem maior eficiência na produção de embriões e prenhez do que doadoras

puras da raça Gir (PONTES et al., 2010). O melhor desempenho dos animais mestiços pode estar associado a heterose promovida pelo cruzamento de duas raças puras, a qual resulta na superioridade fenotípica de um indivíduo sobre seus pais (LIPPMAN; ZAMIR, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os dados de recuperação ovocitária, produção de embrião e taxa de prenhez deste trabalho foram obtidos da base de dados de um laboratório comercial de PIVE localizado na região da zona da mata do estado de Minas Gerais, Brasil. As propriedades comerciais estavam localizadas em região de clima predominante tropical, indicando inverno seco e verão chuvoso. A pluviosidade média anual foi de 1287 mm e temperatura média anual de 20°C ao longo do período do estudo (INMET). Os animais foram criados em sistema semi-intensivo, em áreas de pastagens sombreadas, com regime de pastejo e água *ad libitum* e fornecimento de suplementação mineral. Todos os procedimentos de aspiração folicular, produção *in vitro* de embriões, transferência de embrião, diagnóstico de gestação e sexagem fetal foram realizados pelos mesmos técnicos durante todo o período de análise, compreendido entre 03/04/2014 e 07/12/2016.

3.1 Aspiração folicular e seleção ovocitária

Em dia aleatório do ciclo estral, as doadoras foram submetidas a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), como preconizado por Monteiro *et al.* (2017). Para OPU, foi utilizado aparelho de ultrassonografia modo-B equipado com transdutor microconvexo de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Shenzhen, China). Todos os folículos com diâmetro superior a 2 mm foram aspirados com agulha 20G conectada a um tubo cônico contendo solução tampão fosfato salina (PBS) e 125 UI/mL de heparina (Liquemine, Roche Lab, São Paulo, Brasil) a 37°C. A OPU foi realizada utilizando uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil) com pressão negativa de 90 mm Hg. Posteriormente, os complexos *cumulus*-ovócitos (COCs) foram classificados com auxílio de estereomicroscópio (Coliman, Santo André, Brasil) em graus 1, 2, 3 e 4 de acordo com integridade de citoplasma e número de camadas de células do *cumulus* (Stojkovic *et al.*, 2001). Apenas COCs graus 1, 2, 3 foram considerados viáveis e submetidos à maturação *in vitro*.

3.2 Produção *in vitro* de embriões

3.2.1 Maturação *in vitro*

Os ovócitos selecionados foram alocados em criotubos contendo meio de maturação coberto com óleo mineral e transportados até o laboratório em transportadora portátil (WTA, Cravinhos, Brasil) a 39°C. No laboratório, os criotubos foram transferidos para incubadora a 39°C com 5% de CO₂ em ar até completarem o período de 22 horas de maturação *in vitro* (MIV).

3.2.2 Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Após a MIV, COCs e espermatozoides foram co-incubados por 18 horas a 39°C em 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o dia zero (D0). Para fecundação *in vitro* (FIV), foi utilizado sêmen bovino sexado para cromossomo X rotineiramente utilizado no laboratório. O sêmen foi descongelado a temperatura de 36-37 °C e então submetido à centrifugação no gradiente de Percoll 90% e 45% para seleção espermática. Posteriormente o *pellet* foi lavado com meio Sp-TALP (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995) e ressuspendido em meio de fecundação suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina. Após a seleção espermática por Percoll, a concentração espermática foi determinada utilizando hemocitômetro, sendo que os espermatozoides foram adicionados à gota de meio de fecundação em uma concentração final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL.

3.2.3 Cultivo *in vitro*

Após co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos, citrato e inositol (HOLM et al., 1999), acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB). O cultivo *in vitro* foi

realizado durante sete dias (D7) a 39°C e 5% de CO₂ em ar. No D7 a taxa de blastocisto e estágio de desenvolvimento embrionário foi avaliada com auxílio de um estereomicroscópio. Após classificação, os embriões produzidos foram envasados em palhetas de 0,25 mL, transportados para as propriedades em transportadora portátil de embriões (WTA, Cravinhos, Brasil) a 38,5°C e transferidos a fresco para as receptoras previamente sincronizadas. Todos os embriões independentes do estágio de desenvolvimento foram considerados aptos para a inovulação.

3.3 Transferência de embrião e diagnóstico de gestação

Vacas e novilhas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,5 (escala de 1 a 5) de acordo com Edmonson *et al.*, (1989) foram utilizadas como receptoras. Em dia aleatório do ciclo estral, os animais selecionados foram submetidos a um protocolo hormonal à base de progesterona e benzoato de estradiol para indução do estro no mesmo dia da fecundação *in vitro*.

Para a transferência de embrião, todos os animais foram submetidos a avaliação ultrassonográfica (Mindray DP 2200, Shenzhen, China), sendo considerados aptos para receberem embrião as receptoras que apresentavam corpo lúteo (CL). O tamanho do corpo lúteo foi avaliado e classificado de acordo com Baruselli *et al.* (2003) em CL1 (área > 2,0 cm²), CL2 (área = 1,5-2,0 cm²) e CL3 (área < 1,5 cm²). Os embriões foram transferidos para o corno uterino ipsilateral ao ovário com CL. Após 60 dias (D60), o diagnóstico de gestação e sexagem fetal foram realizados por ultrassonografia transretal de acordo com a metodologia de Ali e Fahmy (2008), sendo considerado fêmea quando o tubérculo genital estava localizado próximo a base da cauda e macho quando estava localizado próximo ao cordão umbilical.

3.4 Análise estatística

Os dados relacionados ao efeito da raça das doadoras, estação do ano e influência do touro na produção de embriões não apresentaram distribuição normal, sendo comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

O efeito da produção ovocitária foi testado pelo teste de ANOVA e comparado pelo teste de Tukey, para análise comparativa do lado da ovulação foi utilizado o teste de qui-quadrado. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), considerando diferenças significativas com $P < 0,05$.

3.5 Experimento 1: Efeito do grau de sangue da doadora na quantidade de ovócitos aspirados, produção de embriões e prenhez

Para avaliar o efeito da raça da doadora na quantidade de COCs aspirados, produção de embriões e prenhez, foi determinada a média de ovócitos totais e viáveis por sessão de OPU em doadoras Girolando $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir; n= 42 OPU/7 doadoras), $\frac{1}{2}$ sangue ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir; n= 462 OPU/145 doadoras) e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês e $\frac{1}{4}$ Gir; 43 OPU/18 doadoras). Os COCs aspirados foram utilizados na PIVE, sendo avaliada a taxa de blastocisto em D7 e a taxa de prenhez aos 60 dias de gestação.

3.6 Experimento 2: Efeito da quantidade de ovócitos aspirados sobre a qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez

Para avaliar se a quantidade de COCs aspirados no momento da OPU poderia influenciar nos índices da PIVE, foram utilizadas doadoras $\frac{1}{2}$ Sangue Gir-

Holandês (n=24) submetidas à ≥ 10 sessões de OPU. De acordo com a quantidade total de ovócitos recuperados por doadora, estas foram divididas em 3 grupos de acordo com a média de COCs recuperados: baixa (< 25 ovócitos; n=8), média (25-30 ovócitos; n=8) e alta (> 30 ovócitos; n=8) quantidade de ovócitos coletados no momento da OPU. Além disso, foi avaliada a influência do número de COCs aspirados na velocidade de desenvolvimento embrionário. Dentro de cada grupo foi determinada a proporção de ovócitos viáveis e a média e porcentagem de embriões produzidos em D7 e prenhez em D60.

3.7 Experimento 3: Efeito da estação do ano na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez

Doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Holandês-Gir (n= 78) que foram aspiradas pelo menos em três estações do ano (n=195 OPU), foram utilizadas para verificar a influência do Verão (n=51 OPU), Outono (n=53 OPU), Inverno (n=38 OPU) e Primavera (n=53 OPU) sobre os índices da PIVE. Dentro de cada grupo foi determinada a quantidade de COCs aspirados, a proporção de ovócitos viáveis, a média e porcentagem de embriões produzidos em D7 e prenhez em D60. Além disso, foi avaliada a influência da estação do ano no volume do corpo lúteo das receptoras de embrião. Também foi avaliado a frequência de ovulação no ovário esquerdo e ovário direito e a relação do lado da ovulação na taxa de prenhez.

3.8 Experimento 4: Efeito do touro na produção de embrião, prenhez e acurácia da sexagem

Para avaliar se o touro influenciou no desenvolvimento embrionário e prenhez, foram utilizados touros da raça Holandês (n=8), utilizados na fecundação

de no mínimo 300 ovócitos. Para cada touro, foi avaliada a taxa de produção de embrião em D7 e prenhez aos 60 dias. Para avaliar acurácia da sexagem expermatoca foi utilizada a técnica de sexagem fetal aos 60 dias de gestação.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Efeito do grau de sangue da doadora na quantidade de ovócitos aspirados, produção de embriões e prenhez

Doadoras $\frac{1}{2}$ sangue ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) apresentaram maior produção de ovócitos viáveis e totais em relação a doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), assim como maior número de embriões produzidos em relação às doadoras $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$, e maior número de prenhez em relação a doadoras $\frac{3}{4}$ (Tabela 1). Entretanto, a porcentagem de prenhez das doadoras $\frac{1}{2}$ sangue foi semelhante aos dois outros graus de sangue, sendo que doadoras $\frac{1}{4}$ obtiveram maior porcentagem de prenhez em relação às doadoras $\frac{3}{4}$ (Tabela 1).

Tabela 1 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês – $\frac{1}{4}$ Gir).

Doadora (n/nOPU)	Ovócito			Embrião		Prenhez	
	Totais	Viáveis	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%
$\frac{1}{4}$ (7/42)	17,6 \pm 1,4 ^b	11,3 \pm 1,0 ^b	63,0 ^a	2,6 \pm 0,3 ^b	24,3 ^a	0,8 \pm 0,1 ^{ab}	41,2 ^a
$\frac{1}{2}$ (145/462)	28,0 \pm 0,8 ^a	19,7 \pm 0,6 ^a	71,5 ^a	4,8 \pm 0,2 ^a	23,3 ^a	1,8 \pm 0,1 ^a	37,7 ^{ab}
$\frac{3}{4}$ (18/43)	25,6 \pm 3,2 ^{ab}	17,8 \pm 2,3 ^{ab}	69,8 ^a	1,6 \pm 0,3 ^b	9,0 ^b	0,6 \pm 0,2 ^b	28,3 ^b

^{a,b} Variáveis com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

4.2 Experimento 2: Efeito da quantidade de ovócitos aspirados sobre a qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez

A quantidade de ovócitos totais e viáveis diferiu entre os três grupos, sendo a porcentagem de ovócitos viáveis superior no grupo de alta, em relação ao de baixa produção de ovócitos (Tabela 2). Ao se avaliar a produção de embrião, foi identificado que doadoras de baixa produção de ovócito tiveram menor quantidade de embriões produzidos, entretanto com maior porcentagem de embriões em relação às doadoras de alta produção de ovócitos (Tabela 2). Para a taxa de prenhez, não foi encontrada diferença entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras ½ sangue Holandês-Gir de baixa (<25 ovócitos totais), média (25-30 ovócitos totais) e alta (>30 ovócitos totais) quantidade de ovócitos coletados no momento das aspirações foliculares guiadas por ultrassonografia (OPU).

Grupo (n doadora/n OPU)	Ovócitos			Embrião		Prenhez	
	Totais	Viáveis	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%
Baixa (8/73)	19,3 \pm 1,0 ^a	13,3 \pm 0,8 ^a	68,9 ^a	5,1 \pm 0,4 ^a	38,4 ^a	1,6 \pm 0,2 ^a	34,2 ^a
Média (8/69)	27,6 \pm 1,3 ^b	19,6 \pm 1,0 ^b	71,0 ^{ab}	6,4 \pm 0,6 ^{ab}	32,7 ^{ab}	1,9 \pm 0,2 ^a	36,6 ^a
Alta (8/120)	38,7 \pm 3,2 ^c	28,0 \pm 3,0 ^c	72,4 ^b	7,1 \pm 1,6 ^b	25,4 ^b	2,2 \pm 0,7 ^a	36,1 ^a

^{a,b,c} Variáveis com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Não foi observado efeito da quantidade de COCs aspirados, sobre o estágio de desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo, sendo que a maioria dos embriões estavam em estágio de blastocisto expandido em D7 (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de embriões de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário em D7 de doadoras ½ sangue Holandês-Gir de baixa (<25 ovócitos totais), média (25-30 ovócitos totais) e alta (>30 ovócitos totais) quantidade de ovócitos totais coletados no momento da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU).

Grupo (n doadora/n OPU)	Estágios de desenvolvimento embrionário (%)				
	BL	BX	BN	BE	Total
Baixa (8/73)	24,4	73,5	1,6	0,3	265
Média (8/69)	20,6	79,3	0,0	0,0	218
Alta (8/120)	21,7	76,7	0,5	0,9	537

BL: Blastocisto; BX: Blastocisto expandido; BN: Blastocisto em eclosão; BE: Blastocisto eclodido. Dados analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4.3 Experimento 3: Efeito da estação do ano na qualidade dos ovócitos, produção de embriões e prenhez

Maior porcentagem de ovócitos viáveis foi observada na estação da primavera em relação ao inverno (Tabela 4). Para as variáveis de produção de embrião e prenhez, não foi identificado efeito da estação do ano (Tabela 4).

Tabela 4 - Média (\pm erro padrão da média) de ovócitos totais e viáveis, taxa de produção de embriões no dia 7 de desenvolvimento e taxa de prenhez de doadoras ½ sangue Gir-Holandês de acordo com a estação do ano.

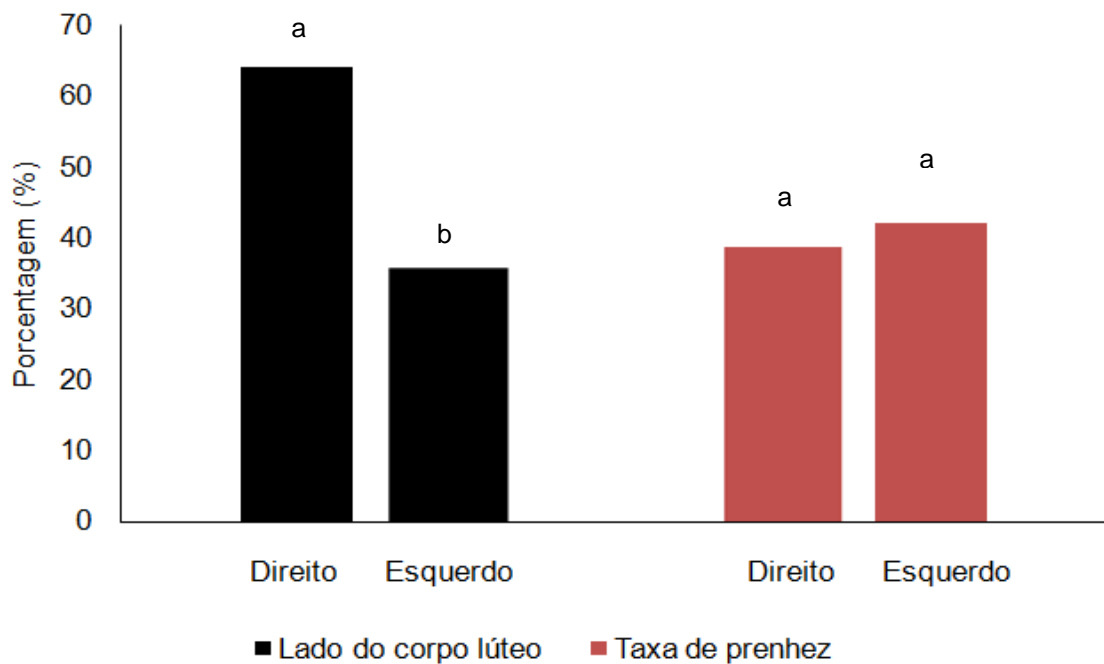
Estação do ano (OPU)	Totais	Viáveis		Embrião		Prenhez	
		\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%
Inverno (38)	34,9 \pm 3,6 ^a	24,2 \pm 2,8 ^a	69,3 ^b	5,2 \pm 0,7 ^a	21,5 ^a	1,9 \pm 0,4 ^a	34,5 ^a
Primavera (53)	28,0 \pm 1,7 ^a	21,0 \pm 1,4 ^a	75,0 ^a	5,8 \pm 0,7 ^a	27,6 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a	39,9 ^a
Verão (51)	36,4 \pm 3,4 ^a	26,7 \pm 2,6 ^a	73,4 ^{ab}	6,6 \pm 1,1 ^a	24,7 ^a	2,2 \pm 0,3 ^a	40,5 ^a
Outono (53)	30,2 \pm 2,6 ^a	21,7 \pm 2,1 ^a	71,9 ^{ab}	6,2 \pm 0,7 ^a	28,6 ^a	2,3 \pm 0,5 ^a	20,8 ^a

^{a,b} Variáveis com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$); OPU= aspiração folicular guiada por ultrassonografia.

Em relação à influência da estação do ano no tamanho do corpo lúteo, não houve efeito da época do ano no tamanho do corpo lúteo, sendo encontrado variação do CL1 entre 9,9 a 20%, CL2 53,2 a 56,5% e CL3 de 25,3 a 34,8% nas diferentes estações ao longo do ano (inverno, verão, outono e primavera).

Em relação ao lado em que ocorreu a ovulação, foi encontrado maior número de ovulações no lado direito, não sendo observada influência do lado do corpo lúteo na taxa de prenhez das receptoras (Figura 2).

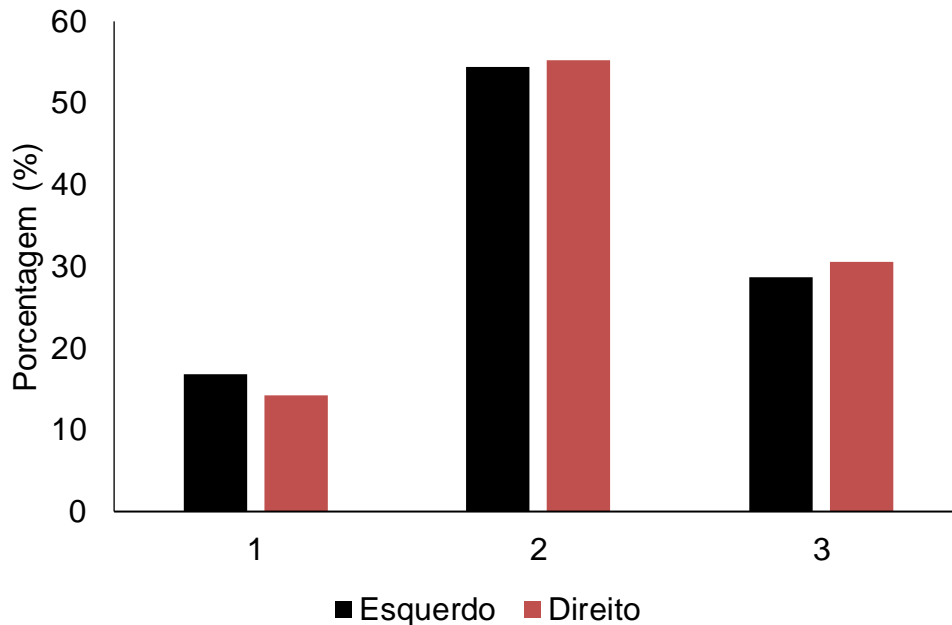
Figura 2 - Porcentagem de ovulação e prenhez de acordo com o lado do ovário em que ocorreu a ovulação.



^{a-b} Letras diferentes em colunas da mesma cor diferem entre si pelo teste qui-quadrado ($P < 0,05$).

O lado que ocorreu a ovulação também não apresentou influência no tamanho do corpo lúteo (Figura 3).

Figura 3 - Porcentagem do tamanho do corpo lúteo de acordo com o lado do ovário em que ocorreu a ovulação.



*Tamanho do corpo lúteo classificado de acordo com Baruselli *et al.* (2003), 1: CL1= área>2,0 cm²; 2:CL2= área 1,5-2,0 cm²; 3:CL3= área<1,5 cm²

*Dados analisados pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$)

4.4 Experimento 4: Efeito do touro na produção de embrião, prenhez e acurácia da sexagem

Foi observado que, independente do touro, os embriões em D7 estavam em sua maioria no estágio de blastocisto expandido, e maior porcentagem de embriões produzidos foi encontrado nos touros 01, 03, 04 e 07 em relação aos touros 02 e 06 (Tabela 7). Não foi observado diferença na taxa de prenhez e no estágio de desenvolvimento embrionário em relação ao touro. Da mesma forma, não foi encontrado efeito do touro na acurácia de sexagem, a qual variou entre 75,0 e 98,0% de acurácia entre os touros.

Tabela 5 - Estágio de desenvolvimento embrionário e porcentagem de embrião em D7 e taxa de prenhez aos 60 dias de acordo com o touro utilizado.

Touro (OPU/OVÓCITOS VIÁVEIS)	BL	BX	BN	BE	Embrião (%)	Prenhez (%)
1 (66/1740)	25,7% ^a	70,7% ^a	0,5% ^a	2,9% ^a	27,7 ^a	31,9 ^a
2 (92/1517)	23,0% ^a	77,0% ^a	0,0% ^a	0,0% ^a	16,4 ^b	31,1 ^a
3 (46/807)	21,0% ^a	77,0% ^a	2,0% ^a	0,0% ^a	34,8 ^a	41,3 ^a
4 (31/608)	26,0% ^a	74,0% ^a	0,0% ^a	0,0% ^a	26,4 ^a	41,8 ^a
5 (14/317)	44,0% ^a	53,0% ^a	2,0% ^a	0,0% ^a	23,9 ^{ab}	43,4 ^a
6 (22/356)	22,0% ^a	75,0% ^a	0,0% ^a	3,0% ^a	9,5 ^b	46,8 ^a
7 (12/365)	46,0% ^a	51,0% ^a	3,0% ^a	0,0% ^a	26,3 ^a	37,2 ^a
8 (13/322)	31,0% ^a	69,0% ^a	0,0% ^a	0,0% ^a	13,9 ^{ab}	28,8 ^a

BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão; BE: blastocisto eclodido.

^{a-b} Variáveis com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito de diferentes graus de sangue de doadoras Girolando, sobre os resultados de um programa de produção *in vitro* de embriões de animais destinado a produção leiteira, assim com a influência da época no ano e número de COCs aspirados sobre diferentes variáveis da PIVE. Doadoras $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir), apresentaram maior produção de ovócitos viáveis e totais em relação a doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), e maior porcentagem de embriões em relação á doadoras $\frac{3}{4}$.

É conhecido que doadoras *Bos indicus* exibem maior número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular do que doadoras *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008), sendo esperado que animais com maior grau de sangue *Bos indicus* apresentem maior quantidade de ovócitos por sessão de OPU.

O maior número de folículos antrais em *Bos indicus* pode estar relacionado às altas dosagens séricas do fator de crescimento hormônio antimulleriano (AMH), (BATISTA et al., 2014; GHANEM et al., 2016), insulina (IGF) I (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003), hormônio do crescimento (GH) e glicose (ALVAREZ et al., 2000; SALES, et al., 2015), que são envolvidos no recrutamento e crescimento folicular inicial, além da proliferação de células da granulosa e da teca (ALVAREZ et al., 2000; GUERREIRO et al., 2014; MONTEIRO et al., 2017). Neste sentido, esperava-se também que animais $\frac{1}{4}$ apresentem maior quantidade de COCs por OPU. Entretanto, o melhor desempenho das doadoras $\frac{1}{2}$ sangue pode ser resultado da maior expressão da heterose nestas doadoras, uma vez que a heterose será mais pronunciada quanto mais geneticamente diferente forem as raças ou linhagens envolvidas no cruzamento, sendo a heterose máxima adquirida nos animais híbridos F1 ou de primeira cruza (MIRANDA; FREITAS, 2009).

Quanto à produção de embriões, doadoras $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) apresentaram maior quantidade de embriões produzidos do que doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir) e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês – $\frac{1}{4}$ Gir), com as doadoras $\frac{3}{4}$ produzindo menor porcentagem de embrião em relação aos outros graus de sangue. Era esperado que

doadoras $\frac{3}{4}$, as quais possuem maior grau de sangue holandês, apresentassem menor porcentagem de embriões produzidos em relação às demais doadoras. De fato, animais *Bos taurus* apresentam menor qualidade e quantidade de ovócitos (LACERDA et al., 2020; PONTES et al., 2010; SALES et al., 2015) e conseqüentemente, influenciam negativamente a porcentagem de produção de embriões. Pontes et al. (2010) não observaram diferenças na produção de embriões e prenhez entre doadoras $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$, porém ambas as doadoras foram mais eficientes na produção de embriões e prenhez do que doadoras puras da raça Gir. Isto confirma a hipótese de que animais cruzados podem apresentar melhor desempenho do que as raças puras utilizadas em seu cruzamento devido à heterose.

Também foi avaliado se a quantidade de COCs por sessão de OPU influenciaria as taxas da PIVE. Doadoras classificadas no grupo de alta produção de ovócitos apresentaram maior quantidade e porcentagem de ovócitos viáveis e número de embriões produzidos em relação às doadoras de baixa produção de ovócito. De fato, a quantidade, assim como a qualidade dos *complexos cumulus* ovócito, é considerada como uma das características que mais influencia a produção *in vitro* de embriões (BATISTA et al., 2016; LOIOLA et al., 2014; VASCONCELOS, 2017).

Segundo Lacerda et al. (2020) e Pontes et al. (2010), a porcentagem de ovócitos viáveis em doadoras taurinas e zebuínas é de aproximadamente 66,5% e 71% respectivamente, sendo esperado que doadoras com maior produção de ovócitos apresentem maior quantidade de ovócitos viáveis. Entretanto a porcentagem de embriões produzidos por doadoras de baixa produção de ovócito foi superior em relação às doadoras de alta produção. Neste estudo foi realizada apenas a avaliação morfológica do COCS, sendo que existem outros fatores moleculares e bioquímicos que podem influenciar o sucesso de um ovócito em gerar um embrião. Na maturação ovocitária ocorrem eventos citoplasmáticos como síntese de proteínas, modificações moleculares, redistribuição das organelas intracelulares e maturação dos mecanismos de liberação do Ca_2 . Portanto vários fatores atuam na aquisição de competência ovocitária, influenciando sua capacidade de se desenvolver a embrião (GOTTARDI; MINGOTI, 2009; STOJKOVIC et al., 2001). É possível que doadoras que apresentem alta produção de ovócitos tenham maior

número de ovócitos sujeitos a alterações nestes fatores, comprometendo sua capacidade em se desenvolver até embrião. Sendo que os genes envolvidos na foliculogênese e oogênese são expressos de forma diferente nas células do cumulus e células da granulosa de doadoras com baixo e alto número de folículos. Essas diferenças moleculares sugerem que a regulação da maturação ovocitária, retomada meiótica e expansão das células do cumulus podem ser influenciadas pelo número de folículos (ROSA et al., 2018). Entretanto é importante ressaltar que esses genes não foram relacionados à competência ovocitária, pois os ovócitos obtidos dos grupos de doadoras apresentaram a mesma capacidade de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Há poucos estudos que compararam as taxas de produção de embriões em animais de diferentes graus de sangue girolando com alta, média e baixa produção ovocitária, sendo que outros fatores podem ser responsáveis pela diferença encontrada entre a porcentagem de embriões produzidos.

Embora a quantidade de COCs obtidos por doadora tenha influenciado na porcentagem de ovócitos viáveis e produção de embrião, não foi encontrado efeito sobre o estágio de desenvolvimento embrionário em D7 e taxa de prenhez. Em estudo realizado por Lacerda *et al.* (2020) e Pontes *et al.* (2011), também não foram encontradas variações na porcentagem de prenhez aos 60 dias entre animais de alta, média e baixa produção de ovócitos, confirmando que a quantidade de COCs recuperados por sessão de OPU, não afeta a prenhez.

Isto ocorre, pois a taxa de prenhez está mais relacionada a fatores inerentes ao embrião, como qualidade do embrião implantado, e estágio de desenvolvimento, e não à quantidade de COCs. Segundo Kubisch *et al.* (2004), blastocistos expandidos possuem níveis mais elevados de interferon-tau (IFN- τ) no meio de cultura em relação aos blastocistos e blastocistos iniciais, mostrando maior capacidade de sinalizar a gestação. Além disso, mesmo os embriões sendo transferidos no mesmo período de desenvolvimento, os embriões que atingirem um estágio de desenvolvimento mais avançado podem ter maior sobrevivência, consequentemente maior taxa de prenhez (LACERDA et al., 2020).

Com relação à estação do ano foi observada maior porcentagem de ovócitos viáveis na estação da primavera em relação ao inverno. Lacerda (2020), avaliando

produção de ovócitos totais de doadoras Gir e ½ sangue no verão em relação ao inverno identificaram maior quantidade de ovócitos durante o verão, correlacionado esta diferença a disponibilidade e qualidade de alimentos nas pastagens. Durante o desenvolvimento do ovócito, o metabolismo da glicose é essencial para o fornecimento de energia para maturação nuclear, expansão das células do *cumulus* e reações de oxirredução, sendo fundamental uma boa alimentação para o fornecimento de glicose (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010).

De fato, espera-se que no inverno tenha uma menor qualidade ovocitária, visto que na estação da seca/inverno há menor umidade no solo, baixas temperaturas e fotoperíodo reduzido, gerando pastagem com menor qualidade nutricional (LIU et al., 2018; PETERSON; SHEAFFER; HALL, 1992; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS et al., 2004). Com isso, durante a estação da seca/inverno, a baixa disponibilidade de forragem associada ao aumento da porção fibrosa das forrageiras, limita a ingestão e o atendimento das exigências nutricionais, suprimindo menos de 60% destas necessidades para animais que são mantidos em sistema de pastejo na estação da seca (BARBERO, 2016; OLIVEIRA, 2014; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS et al., 2004). Com o início das chuvas, e reestabelecimento da qualidade das pastagens na estação da primavera, ocorre melhoria no fornecimento nutricional e energético dos animais justificando a melhor qualidade dos ovócitos nesta estação.

Além da avaliação das doadoras, foi avaliado também a incidência de ovulação nos ovários direito ou esquerdo das receptoras, sendo encontrado maior número de ovulações no ovário direito em relação ao ovário esquerdo. Outros estudos relataram resultado semelhante (DEMCZUK et al., 1998; FERREIRA; SÁ; VETROMILA 1998; SPELL et al., 2001; VIANA et al., 1999), os quais atribuem estes resultados pela menor circulação sanguínea que chega ao ovário esquerdo, provocada pela compressão do rúmen localizado no lado esquerdo da cavidade abdominal. Com isto, os níveis séricos de hormônios que chegam ao ovário esquerdo, como hormônio folículo estimulante (FSH), pode ser menor, com prejuízo do crescimento folicular, e conseqüentemente na taxa de ovulação observada entre os ovários (FERREIRA; SÁ; VETROMILA, 1998).

Não foi observada variação entre os touros em relação à influência no estágio de desenvolvimento embrionário. Isto mostra que o touro não exerce influência na velocidade do desenvolvimento dos embriões. Entretanto, ocorreram variações na porcentagem de embrião de acordo com o touro utilizado, o que se assemelha a outros estudos que mostram variações na taxa de fertilidade entre touros tanto *in vivo* (FILHO et al., 2009; WARD et al., 2001) quanto *in vitro* (ALOMAR et al., 2008; MACHADO et al., 2009; SAMARDZIJA et al., 2006).

Esta diferença na fertilidade vem sendo amplamente estudada por diferentes grupos de pesquisa, associando variações na fertilidade do touro à qualidade seminal (ALOMAR et al., 2006; TANGHE et al., 2002), composição da proteína da membrana plasmática do espermatozoide (RONCOLETTA et al., 2006), perfil de expressão de genes do espermatozoide (KHATIB et al., 2009), e micro RNA (GOVINDARAJU et al., 2012), assim como diferenças na sensibilidade dos espermatozoides de alguns animais ao processo de sexagem (SERAFIM et al., 2018).

Outra avaliação relacionada ao touro foi referente a acurácia da sexagem espermática, sendo observado que a técnica de sexagem foi igualmente eficiente para a determinação do sexo, independente do touro. Desde o desenvolvimento da tecnologia de sexagem espermática por citometria de fluxo, em 1989 até o presente momento a acurácia de sexagem é de aproximadamente 90%, independente se a sexagem espermática é realizada para fêmea ou para macho (JOHNSON; WELCH, 1999; SEIDEL JR, 2003).

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que doadoras $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$ Holandês – $\frac{1}{2}$ Gir) apresentam maior produção de ovócitos do que doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), e possuem maior eficiência na produção de embriões do que doadoras $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{4}$ Holandês – $\frac{3}{4}$ Gir), e $\frac{3}{4}$ ($\frac{3}{4}$ Holandês – $\frac{1}{4}$ Gir). Além disso, foi observado que a alta produção de ovócito é uma característica positiva relacionada a qualidade dos ovócitos e que a estação de inverno influencia negativamente na porcentagem de ovócitos recuperados em a pasto. Por último, o touro apresenta influência na porcentagem de embriões produzidos e não interfere na acurácia da técnica de sexagem espermática.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, A.; FAHMY, S. Ultrasonographic fetometry and determination of fetal sex in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.106, n.1-2, p.90-99, 2008. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.04.010.
- ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, n.3, p.395-402, 2006. Doi: 10.1071/RD05132.
- 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 sêmen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.1-2, p.48-61, 2008. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.06.009.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, C.C.J.; PLAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during anestrus cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, n.5, p.1291-1302, 2000. Doi: 10.2527/2000.7851291x.
- ALVIM, M.J.; PACIULLO, D.S.C.; CARVALHO, M.M.; AROEIRA, L.J.M.; CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; GOMES, A.T.; MIRANDA, J.E.C.; RIBEIRO, A.C.C.L. Sistema de produção de leite com cria de novilhas em sistemas silvipastoris. **Embrapa Gado de Leite**, Sistema de Produção, n.7, 2005.
- ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: Associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1624-1632, 2001. Doi: 10.1095/biolreprod64.6.1624.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE GIROLANDO (ABCG). Evolução dos índices zootécnicos do rebanho Girolando (de 1989 a 2017), 2018. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>> Acesso em: 07 de dez. 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Vendas de sêmen crescem 18% no acumulado de 2019. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/vendas-de-semen-crescem-18-no-acumulado-de-2019/>> Acesso em: 07 dez. 2020.
- BALDRIGHT, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D. Novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas apresentam diferenças na dinâmica folicular e luteal durante o ciclo estral quando comparadas

no mesmo ambiente e manejo nutricional. In: XXVI Reunião Anual da SBTE, **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2012, p.337.

BALDRIGHT, J.M; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.; LOPES, R.N.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPCÃO, M.E.O.D. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.6, p.1015-1020, 2014. Doi: 10.1111/rda.12430.

BARBERO, R.P. Altura do pasto e suplementação na recria de tourinhos e efeitos sobre a terminação. Orientador: Euclifés Braga Malheiros. 2016. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BARBOSA, P.F.; PEDROSO, A.F.; NOVO, A.L.M.; RODRIGUES, A.A.; CAMARGO, A.C.; POTT, E.B.; SCHIFFLER, E.A.; AFONSO, E.; OLIVEIRA, M.C.S.; TUPY, O.; BARBOSA, R.T.; LIMA, V.M.B. Raças. **Embrapa gado de leite**, sistema de produção 4, 2002.

BARUSELLI, P.S; MARQUES, M.O.; CARVALHO, A.T.; BERBER, R.C.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.; COSTA NETO, W.P. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with "Ovsynch" protocol for fixed-time embryo transfer. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.26-106, 2003. Doi: 10.1590/S1413-95962003000800003.

BATISTA, E.O.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.; SÁ FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.; RENNO, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (nelore) and *Bos taurus* (holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.3, p.448-452, 2014. Doi: 10.1111/rda.12304.

BATISTA, J.F.; SILVA, L.F.; LARAZI, L.P.; LEAL, M.G.O.; SOUZA, M.M.; GARCIA, S.M. Avaliação morfológica e nuclear de oócitos bovinos imaturos, obtidos de ovários com e sem a presença de corpo lúteo. **Colloquium Agrariae**, v.12, n.2, p.01-05, 2016. DOI: 10.5747/ca.2016.v12.n2.a133.

BECHER, B.G.; NETO, A.P.; OLIVEIRA, W.; MOTA, M.F.; JELONSCHEK, J.P. Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico, v.15 n.28, p. 554, 2018.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p. 307-332, 2003. Doi: 10.1016/S0378-4320(03)00097-6.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.595-604, 2001. Doi: 10.1590/S0102-09352001000500015.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; ROCHA JUNIOR, V.R.; RUAS, J.R.M.; GIOSO, M.M.; FONSECA, J.F.; CARVALHO, G.R.; MAFFILI, V.V. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.346–354, 2004. Doi: 10.1590/S0102-09352004000300010.

BORGES C. R. A.; AZEVEDO M.; LIMA I. A.; BRASIL L. H. A.; FERREIRA M. A. Heterogeneous genetic cows of three genetic groups in feedlot system in the state of Pernambuco, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v.34, n.1, p. 91-96, 2012. Doi: 10.4025/actascianimsci.v34i1.11306.

CAMARGO, L.S.; VIANA, J.H.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CANAZA-CAYO, A.W.; LOPES, P.S.; SILVA, M.V.G.B.; COBUCI, J.A.; TORRES, R.A.; MARTINS, M.F.; ARBEX, W.A. Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, v.44, n.11, p.2072-2077, 2014. Doi: 10.1590/0103-8478cr20131307.

CARVALHO, J.P.B.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito da luteólise precoce em protocolos de IA cronometrada à base de progesterona em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus*. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.035.

DALTRO, D.S. Heterose na curva de lactação de bovinos da raça girolando. Orientador: Jaime Araújo Cobuci. 2018. 145f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

DEGEFA, T.; LEMMA, A.; JEMAL, J.; MAMO, G.; TEGEGNE, A.; YOUNGS, C.R. Ovarian follicular dynamics in purebred and crossbreed Boran cows in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.33, p.1763-1770, 2016. Doi: 10.5897/AJB2016.15267.

DEMCZUK, E.; KOZICKI, L.E.; PONTELLI, E.S.; SALLES, J.O. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.35, n.4, p.174-177, 1998.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEARVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.68-78, 1989. Doi: 10.3168/jds. S0022-0302(89)79081-0

Estratégia de Cruzamento Girolando – Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (2020). Disponível em:

<<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,2,pt>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; MARTINS FILHO, R.; LIMA, F.A.M. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.34, n.6, p.1920-1926, 2005.

FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; VETROMILA, M.A.M. Ovulação e gestação de vacas mestiças lado de maior frequência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.435-437, 1998.

FILHO, O.G.S.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility, **Theriogenology**, v.72, n.2, p.10-218, 2009. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.008.

FISCHER, A.E.; BERNAL, D.P.; GUTIERREZ-ROBAYO, C.; RUTLEDGE, J.J. Estimates of heterosis for in vitro embryo production using reciprocal crosses in cattle. **Theriogenology**, v.54, n.9, p.1433-1442, 2000. Doi: 10.1016/S0093-691X(00)00465-9.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTII, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003. Doi: 10.1016/S0093-691X(02)01243-8

GHANEM, N.; JIN, J.I.; KIM, S.S.; CHOI, B.H.; LEE, K.L.; HA, A.N.; SONG, S.H.; KONG, I.K. The anti-mullerian hormone profile is linked with the in vitro embryo production capacity and embryo viability after transfer but cannot predict pregnancy outcome. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, n.2, p.301-310, 2016. Doi: 10.1111/rda.12681.

GIMENES, L.U. Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. Orientador: Pietro Sampaio Baruselli. 2010. 123f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós – Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GOVINDARAJU, A.; UZUN, A.; ROBERTSON, L.S.; ATLI, M.O.; KAYA, A.; TOPPER, E.; CRATE, E.A.; PADBURY, J.; PERKINS, A.; MEMILI, E. Dynamics of microRNAs in Bull spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n.82, 2012. Doi: 10.1186/1477-7827-10-82.

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.

GUERREIRO, B.M.; BATISTA, E.O.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO NETO, A.; SILVEIRA, C.R.; BAYEUX, B.M.; DIAS, E.A.; MONTEIRO, F.M.; ACCORSI, M.; LOPES, R.N.; BARUSELLI, P.S. Plasma anti-mullerian hormone: na endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v.49, p.96-104, 2014. Doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa médium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999. Doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Produtividade de leite cresce 62% em 11 anos; produção chega a 30 bilhões de litros, Censo Agropecuário 2017, 2017. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/26457-produtividade-de-leite-cresce-62-em-11-anos-producao-chega-a-30-bilhoes-de-litros>> Acesso em: 07 dez. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf>. Acesso em: 28 de jul. 2020

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Estações convencionais – planilhas. Disponível em: <<https://bdmep.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 15 de fev. 2021.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1323-1341, 1999. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00220-4.

KATHIB, H.; HUANG, W.; WANG, X.; TRAN, A.H.; BINDRIM, A.B.; SCHUTZKUS, V.; MONSON, R.L.; YANDELL, B.S. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.5, 2009. Doi: 10.3168/jds.2008-1767.

KUBISCH, H.M.; SIRISATHEIN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; CLEMENTS, G.; LIUKKONEN, J.R.; BRACKETT, B.G. Effects of developmental stage, embryonic interferon- τ secretion and recipient synchrony on pregnancy rate after transfer of in vitro produced bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.2, p.120-124, 2004. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2004.00491.x.

LACERDA, I.P.; DODE, M.A.N.; LIMA, M.M.S.; GUERRA, B.F.; COSTA, E.S.; MOREIRA, G.R.; CARVALHO, J.O. Donor breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. **Livestock Science**, v.240, p.104-135, 2020. Doi: 10.1016/j.livsci.2020.104135.

LACERDA, I.P. Características moleculares e qualidade de complexos cumulus-ovócito de doadoras de diferentes genótipos no verão e inverno. Orientador: José de Oliveira Carvalho Neto. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2020.

LEITE, M.B. Desempenho produtivo e reprodutivo de grupos genéticos da raça Girolando. Orientador: Ricarda Maria dos Santos. 2016. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Programa de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

LIPPMAN, Z. B.; ZAMIR, D. Heterosis: revisiting the magic. **Trends in genetics**, v. 23, n.2, p.60-66, 2007. Doi: 10.5402/2012/682824.

LIU, Y.; WU, Q.; GE, G.; HAN, G.; JIA, Y. Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. **BMC Plant Biology**, v.18, n.1, p.13, 2018. Doi: 10.1186/s12870-017-1226-9.

LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A.S.; FERRAZ, P.A.; BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, Goiânia, 2014. DOI: 10.5216/cab.v15i1.23327.

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. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.

MIRANDA, J.E.C.; FREITAS, A.F. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. **Embrapa**, Juiz de Fora, 2009.

MONTEIRO, F.M.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; BAYEUX, B.M.; ACCORSI, M.; CAMPANHOL, I.; DIAS, E.A.R.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v.90, n.1, p.54-58, 2017. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002.

NASCIMENTO, S.T.; ROSSETTO, Y.P.; SILVA, A.A.; LEAN, A.B.B.; TENÓRIO, J.P.L. Influência da temperatura ambiente no verão na produção de leite de vacas holandesas. **Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, n.3, p.217-223, 2017. Doi: 10.22256/PUBVET.V11N3.217. – 223.

OLIVEIRA, A.A.D. Manejo do pasto de capim-marandu e suplementação com diferentes fontes de energia na recria de tourinhos Nelore. Orientador: Ricardo Andrade Reis. 2014. 135f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; CAMARGO, A.J.R.; FREITAS, C.; IGUMA, L.T.; CARVALHO, B.C.; CAMARGO, L.S.A.; OLIVEIRA, L.Z.; VERNEQUE, R.S. Oocyte origin affects the in vitro embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. **Animal Reproduction Science**, v.209, p.106-165, 2019. Doi: 106165. doi:10.1016/j.anireprosci.2019.106165

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995. Doi: 10.1016/0093-691X(95)00271-9.

PETERSON, P.; SHEAFFER, C.; HALL, M. Drought effects on perennial forage legume yield and quality. **Agronomy Journal**, v.84, n.5, p.774-779, 1992. Doi: 10.2134/agronj1992.00021962008400050003x.

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, n.8, p. 1349-1355, 2010. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.004.

PONTES, J.H.F.; STERZA, F.A.M.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pickup, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p. 1640-1646, 2011. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026.

PRATA, A.B. Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção *in vitro* de embriões bovinos. Orientador: Roberto Sartori Filho. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagem, Universidade Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

REIS, R.A.; BARBERO, R.A.; HOFFMANN, A. Impacts of forage quality on beef cattle production systems. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.37, n.292, p. 36-53, 2016.

RONCOLETTA, M.; MARONI, E.S.C.; ESPER, C.R.; BARNABE, V.H.; FRANCESCHINI, P.H. Fertility-associated proteins in Nelore Bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v.91, n.1-2, p.77-87, 2006. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.03.014.

ROSA, C.O.; MARINHO, L.S.R.; ROSA, P.R.A.; CESARO, M.P.; LUNARDELLI, P.A.; SILVA-SANTOS, K.C.; BASSO, K.C.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M.M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.4, p.921-929, 2018. Doi: 10.1111/rda.13189.

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 Dairy Science**, v.98, n.5, p.3086-3099, 2015. Doi: 10.3168/jds.2014-8858.

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. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.005.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.11, p.2831-2842, 2002. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74370-1.

SANTOS, D.S. Efeitos genético aditivos e não aditivos para características produtiva e reprodutivas de bovinos leiteiros mestiços no agreste de Pernambuco. Orientador: Angelina Bossi Fraga. 2015. 37f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós - Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2015.

SANTOS, E.D.G.; PAULINO, M.F.; QUEIROZ, D.S.; FILHO, S.C.V.; FONSECA, D.M.; LANA, R.P. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: 1. Características químico-bromatológicas da forragem durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.203-213, 2004. Doi: 10.1590/S1516-35982004000100024.

SANTOS, E.D.G.; PAULINO, M.F.; QUEIROZ, D.S.; FONSECA, D.M.; FILHO, S.C.V.; LANA, R.P. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf. 2. Disponibilidade de forragem e desempenho animal durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.214-224, 2004. Doi: 10.1590/S1516-35982004000100025.

SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUNOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of

supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**, v.46, p.339-354, 2006. Doi: 10.1051/rnd:2006016.

SEIDEL JR, G.R. Economics of selecting for sex: the most important genetic tract. **Theriogenology**, v.59, p.585-598, 2003. Doi: 10.1016/s0093-691x(02)01242-6.

SERAFIM, P.R.; GOMES, L.P.M.; GOMES, G.M.. CRESPILO, A.M. Sêmen bovino sexado: A produção *in vitro* de embriões pode ser influenciada pelo touro doador do material genético? **Revista de Saúde**, v.9, n.1, p.04-08, 2018. Doi: 10.21727/rs.v9i1.1298.

SILVA, A.P.T.B.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês *versus* Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.72, n.1, p.51-58, 2015. Doi: 10.17523/bia.v72n1p51.

SILVA, M.V.G.B.; PANETTO, J.C.C.; MARTINS, M.F.; MACHADO, M.A. Girolando: dos cruzamentos aleatórios até a seleção genômica. **Embrapa**, Anuário Leite, 2019. Disponível em: < file:///C:/Users/DELL/Downloads/Anuario-LEITE-2019%20(2).pdf > Acesso em: 07 dez. 2020.

SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, n.2, p.287- 297, 2001. Doi: 10.1016/s0093-691x(01)00563-5.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology Reproduction**, v.64, n.3, p.904-909, 2001. Doi: 10.1095/biolreprod64.3.904.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction: the official journal of the Society for the Study of Fertility**, v. 139, n.4, p.685-695, 2010. Doi: 10.1530/REP-09-0345.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; STERCKX, V.; MAES, D.; KRUIF, A.D. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.3, p.127-132, 2002. Doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00343.x.

TORRES, H.A.L.; TINEO, J.S.A.; RAIDAN, F.S.S. Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v.64, n.247, p.255-260, 2015.

VASCONCELOS, G.L. Relação entre a quantidade oocitária, produção in vitro de embriões e características de fertilidade em vacas Brahman e Simental. Orientador: José Camisão de Souza. 2017. 151f. Tese (Doutorado em Produção e Nutrição de Ruminantes) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.251-256, 1999. Doi: 10.1590/S0102-09351999000300009.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, p. 12-18, 2012.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, n.1, p.47-55, 2001. Doi: 10.1002/mrd.1060.