

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**Fatores Ambientais e Genéticos Relacionados à Produção *In vitro* de
Embriões na Raça Gir**

Lethissia Amorim da Silva Coelho

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FATORES AMBIENTAIS E GENÉTICOS RELACIONADOS À
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA GIR**

Lethissia Amorim da Silva Coelho

Sob a Orientação do Professor
Rondineli Pavezzi Barbero

e Co-orientação dos Professores
Elisandra Lurdes Kern
Jaime Araujo Cobuci

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal, Área de Concentração
Zootecnia

Seropédica, RJ

Junho de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca
Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C672f Coelho, Lethissia Amorim da Silva, 1996-
Fatores Ambientais e Genéticos Relacionados à
Produção In vitro de Embriões na Raça Gir / Lethissia
Amorim da Silva Coelho. - Barra do Piraí, 2025.
56 f.

Orientador: Rondineli Pavezzi Barbero.
Coorientadora: Elisandra Lurdes Kern.
Coorientador: Jaime Araujo Cobuci.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PGCA, 2025.

1. Parâmetros Genéticos . 2. Criopreservação . 3.
Herdabilidade. 4. Oócitos Grau I. 5. Produção in vitro
de embriões . I. Barbero, Rondineli Pavezzi , 1983-,
orient. II. Kern, Elisandra Lurdes, -, coorient. III.
Cobuci, Jaime Araujo , -, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. PGCA. V. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LETHISSIA AMORIM DA SILVA COELHO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO, APROVADA EM 17/06/2025

Documento assinado digitalmente
 **ELISANDRA LURDES KERN**
Data: 25/07/2025 16:46:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

Elisandra Lurdes Kern. Dra. UFRRJ
(Co-orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **ANA LUCIA PUERRO DE MELO**
Data: 25/07/2025 16:26:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

Ana Lúcia Puerro de Melo Dra. UFRRJ

Documento assinado digitalmente
 **GIOVANI LUIS FELTES**
Data: 25/07/2025 14:39:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

Giovani Luis Feltes Dr. UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar nos momentos mais difíceis, por me dar forças quando pensei em desistir e por sempre iluminar meu caminho com fé e esperança.

À minha família, base de tudo na minha vida, pelo amor incondicional e pelo apoio constante em cada etapa da minha jornada. Aos meus pais, Cecília e Sidinei, que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse seguir os meus sonhos, mesmo diante dos desafios. À minha irmã, Isabella, que esteve e está sempre ao meu lado, me apoiando, me escutando e acreditando em mim, mesmo quando eu duvidava.

A todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte desta caminhada, deixo aqui meu carinho e minha gratidão. Em especial ao Elder, que esteve comigo nos últimos meses do mestrado, me apoiando, me motivando e me ajudando a continuar quando tudo parecia difícil.

À minha orientadora Elisandra, por sua paciência, dedicação e cuidado ao me ensinar e me guiar durante esses dois anos. Sei que não sou uma aluna fácil e que, muitas vezes, sou teimosa — e por isso, agradeço ainda mais por sua compreensão e persistência.

Ao professor Marco, por ter me acolhido com generosidade e me ajudado em momentos decisivos desse processo. Ao professor Jaime Cobuci, que, mesmo à distância, nunca deixou de me orientar e contribuir para o meu crescimento acadêmico.

Ao professor Sérgio Trabali, da Pesagro, por ter me acolhido como bolsista em seu projeto, o que foi fundamental para a realização deste mestrado. Além disso, agradeço pela atenção, respeito e compreensão com que sempre me tratou.

Agradeço também aos professores Marina e Rondineli, que contribuíram de forma significativa com minha formação acadêmica e sempre me orientaram com dedicação e gentileza ao longo da minha trajetória.

Ao Lucas, minha profunda gratidão por todo o apoio, incentivo e parceria ao longo deste caminho. Sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho, e sou muito grata por ter contado com você.

A todos vocês, meu muito obrigada. Essa conquista também é de vocês.

RESUMO GERAL

COELHO, Lethissia Amorim da Silva. **Fatores Ambientais e Genéticos Relacionados à Produção *In vitro* de Embriões na Raça Gir**. 2025. 48p Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A presente dissertação investiga os fatores ambientais e genéticos que afetam a produção *in vitro* de embriões na raça Gir leiteiro, fundamentando-se na necessidade de aprimorar as técnicas reprodutivas em um contexto de crescente demanda por produção de alimentos. O Capítulo I investiga os fatores ambientais que influenciam a produção *in vitro* de embriões e a taxa de prenhez, destacando a relação entre variáveis climáticas, como estação do ano, e variáveis como idade e categoria da doadora sobre a competência oocitária e taxa de prenhez. Foram analisados dados de 15.894 aspirações foliculares de 3.682 doadoras, considerando a média de oócitos viáveis, a proporção de oócitos viáveis, taxa de blastocisto e a taxa de prenhez. Os resultados indicaram que o estresse térmico exerce uma influência negativa sobre a qualidade dos oócitos e, consequentemente, nas taxas de sucesso das transferências embrionárias. O Capítulo II amplia a discussão ao estimar parâmetros genéticos para características morfológicas dos oócitos, a produção *in vitro* de embriões viáveis e a taxa de prenhez. Foram utilizados 16.806 registros de aspiração folicular de 4.071 doadoras, coletados entre 2009 e 2024 em seis rebanhos de Minas Gerais. As análises foram conduzidas com modelos lineares mistos. As características analisadas incluíram o número e a porcentagem de oócitos viáveis, graus morfológicos e a taxa de prenhez, revelando que fatores genéticos têm um papel essencial no desempenho reprodutivo das doadoras. A soma das análises de ambos os capítulos destaca a importância de uma abordagem integrada que leve em conta tanto os fatores ambientais quanto genéticos na seleção de doadoras. Os dados obtidos possibilitam o desenvolvimento de estratégias de manejo que visem não apenas a qualidade dos oócitos, mas também a eficiência na produção e transferência de embriões. Dessa forma, a dissertação contribui para o entendimento das especificidades da raça Gir leiteiro e a necessidade de pesquisas focadas no aprimoramento das práticas de reprodução assistida, visando aumentar a produtividade e sustentabilidade da cadeia produtiva do leite no Brasil. Em conclusão, os resultados indicam que fatores climáticos adversos e características genéticas das doadoras impactam diretamente a produção de embriões *in vitro* e a taxa de prenhez, sugerindo que um manejo adequado e uma melhor compreensão dos aspectos zootécnicos têm potencial para otimizar a eficiência reprodutiva na raça Gir leiteiro. A pesquisa não apenas evidencia o cenário atual, mas também pontua direções futuras para o desenvolvimento das técnicas na produção animal.

Palavras-chave: Características Oocitárias, Parâmetros Genéticos, Reprodução Animal.

ABSTRACT

Coelho, Lethissia Amorim da Silva. **Environmental and Genetic Factors Related to *In vitro* Embryo Production in the Gir Breed**. 2025. 48p Thesis (Master Science in Animal Science) Institute of Animal Science, Animal Science Graduate Program, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

This present study investigates the environmental and genetic factors that affect *in vitro* embryo production in the dairy Gir breed, based on the need to improve reproductive techniques in a context of increasing demand for food production. Chapter I examines the environmental factors that influence *in vitro* embryo production and pregnancy rate, highlighting the relationship between climatic variables, such as season, and variables such as age and category of the donor on oocyte competence and pregnancy rate. Data from 15,894 follicular aspirations from 3,682 donors were analyzed, considering the average number of viable oocytes, the proportion of viable oocytes, the blastocyst rate and the pregnancy rate. The results indicated that heat stress exerts a negative influence on oocyte quality and, consequently, on the success rates of embryo transfers. Chapter II expands the discussion by estimating genetic parameters for oocyte morphological characteristics, *in vitro* production of viable embryos, and pregnancy rate. A total of 16,806 follicular aspiration records from 4,071 donors, collected between 2009 and 2024 in six herds in Minas Gerais-Brazil, were used. The analyses were conducted with linear mixed models. The analyzed characteristics included the number and percentage of viable oocytes, morphological grades, and pregnancy rate, revealing that genetic factors play an essential role in the reproductive performance of donors. The sum of the analyses from both chapters highlights the importance of an integrated approach that takes into account both environmental and genetic factors in donor selection. The data obtained allow the development of management strategies that target not only oocyte quality, but also efficiency in embryo production and transfer. Thus, the dissertation contributes to the understanding of the specificities of the dairy Gir breed and the need for research focused on improving assisted reproduction practices, aiming to increase the productivity and sustainability of the milk production chain in Brazil. In conclusion, the results indicate that adverse climatic factors and genetic characteristics of donors directly impact the production of *in vitro* embryos and the pregnancy rate, suggesting that adequate management and a better understanding of zootechnical aspects have the potential to optimize reproductive efficiency in the dairy Gir breed. The research not only highlights the current scenario, but also points out future directions for the development of techniques in animal production.

Keywords: Oocyte Traits, Genetic Parameters, Animal Reproduction.

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Raça Gir Leiteiro.....	2
2.2 Tecnologias de Reprodução Assistida para Produção de Embriões no Brasil	3
2.3 Produção <i>in vitro</i> de Embriões	4
2.4 Características de Qualidade de Oócitos e de Embriões	5
2.5 Componentes Ambientais que Afetam a Qualidade de Oócitos e Embriões	6
2.6 Componente Genético da Produção de Embriões <i>in vitro</i>	7
2.7 Referências Bibliográficas	7
3 CAPÍTULO I.....	11
FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES NA RAÇA GIR	11
3.1 Introdução.....	13
3.2 Material e Métodos	14
3.2.1 Descrição dos dados.....	14
3.2.2 Recuperação de oócitos, produção <i>in vitro</i> de embriões e vitrificação.....	14
3.2.3 Características analisadas.....	15
3.2.4 Modelo estatístico e transformação dos dados	15
3.2.5 Análises experimentais	15
3.2.6 Modelo estatístico	16
3.3 Resultados	16
3.4 Discussão	20
3.5 Conclusões.....	23
3.6 Referências Bibliográficas	24
4 CAPÍTULO II	27
PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE OÓCITOS, PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES E PRENHEZ NA RAÇA GIR LEITEIRO.....	27
4.1 Introdução.....	29
4.2 Material e métodos	31
4.2.1 Descrição dos dados.....	31
4.2.2 Características analisadas.....	31
4.2.3 Transformação dos dados	31
4.2.4 Análise estatística.....	31
4.2.5 Estimação de parâmetros genéticos	32
4.2.6 Correlação de Spearman.....	33
4.2.7 Tendência genética	33
4.3 Resultados	33
4.4 Discussão	40
4.5 Conclusões.....	45
4.6 Referências Bibliográficas	46
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional global, aliado ao aumento do consumo per capita de alimentos, tem impulsionado a busca por alternativas que aumentem a eficiência e a sustentabilidade dos sistemas de produção animal (SAATH; FACHINELLO, 2018). O Brasil, com sua ampla extensão territorial, clima favorável e um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, ocupa posição de destaque no cenário agropecuário internacional (BRAZILIAN BEEF; ABIEC, 2022). Nesse contexto, a utilização de biotecnologias reprodutivas tornou-se uma estratégia fundamental para maximizar o desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos bovinos. Técnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação, produção *in vitro* de embriões (PIVE) e transferência de embriões (TE) têm permitido o uso intensivo de material genético superior, contribuindo significativamente para os programas de melhoramento genético (SARTORI et al., 2016; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

A raça Gir leiteiro, originária da Índia e introduzida no Brasil no início do século XX, destaca-se entre as raças zebuínas por sua adaptabilidade ao clima tropical, rusticidade, resistência a endo e ectoparasitas, e pela produção de leite com altos teores de gordura e proteína (TEODORO et al., 2000; LEDIC et al., 2002). Essas características têm incentivado sua crescente utilização em sistemas de produção leiteira de base zebuína e nos programas de melhoramento para leite tipo A2, que apresenta melhor digestibilidade para indivíduos com intolerância à proteína beta-caseína A1 (TEODORO et al., 2000). Apesar dos avanços tecnológicos, a eficiência da PIVE em bovinos ainda é limitada por uma série de fatores ambientais, fisiológicos e genéticos, que afetam desde a coleta de oócitos até o desenvolvimento embrionário (ANDRADE et al., 2012; MELLO et al., 2016). A variabilidade no desempenho reprodutivo das doadoras também está associada à idade, categoria fisiológica, condições nutricionais e ambientais, bem como à genética individual (MERTON et al., 2003; GIBBONS et al., 1994).

Diante disso, a presente dissertação está organizada em dois capítulos que abordam, de forma complementar, os principais fatores que interferem na produção *in vitro* de embriões em doadoras da raça Gir leiteiro, com o objetivo de ampliar o conhecimento técnico-científico sobre a aplicação e otimização dessa biotecnologia.

No Capítulo I, são investigados os efeitos de variáveis ambientais (como a estação do ano), da idade e da categoria das doadoras, bem como do tipo de transferência embrionária (a fresco ou vitrificada), sobre a produção de oócitos viáveis, competência oocitária e a taxa de prenhez. Esses fatores são fundamentais para compreender a variabilidade dos resultados obtidos com a PIVE em condições tropicais.

O Capítulo II aprofunda a análise ao estimar parâmetros genéticos para características associadas à qualidade oocitária, à produção embrionária e à taxa de prenhez, permitindo avaliar o potencial de seleção genética com base em tais características. Este capítulo visa contribuir para a inclusão de características reprodutivas ainda pouco exploradas nos programas de melhoramento genético da raça Gir leiteiro.

Assim, esta dissertação busca integrar aspectos ambientais e genéticos no estudo da eficiência reprodutiva de doadoras Gir, fornecendo subsídios práticos e científicos para a melhoria contínua das técnicas de PIVE. Espera-se que os resultados obtidos possam apoiar estratégias de manejo mais precisas e orientar a seleção de doadoras com maior desempenho reprodutivo, contribuindo para a sustentabilidade e produtividade da pecuária leiteira nacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raça Gir Leiteiro

Dentre as raças zebuínas, o Gir se destaca pelo potencial leiteiro obtido em clima tropical, o que faz do Brasil um ambiente adequado para expressar seu potencial produtivo, apresentando destaque no cenário da pecuária leiteira nacional (SANTOS, 2007). De acordo com a Associação Brasileira dos criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL) o animal dessa raça pode chegar a um média de produção de 3.451 ± 1.978 Kg de leite aos 305 dias de lactação (PANETTO et al., 2019).



Figura 01. Animal da raça Gir Leiteiro em pastagem (ABCGIL, 2025).

Apesar de não ser a raça com maior capacidade leiteira, quando comparada às raças europeias, dentre as raças zebuínas é a que possui maior produção de leite. Além disso, é uma raça que possui adequada resistência a endoparasitas e ectoparasitas e ao estresse térmico, conseguindo suportar as altas temperaturas sem afetar sua produção. Estes animais são eficientes no aproveitamento de pastagens de baixa qualidade, tornando a atividade em sistemas extensivos e menos tecnificados mais lucrativa, entregando um produto de alto valor biológico, como o leite rico em proteína e gordura. Por ser uma raça mais rústica e resistente às doenças, apresenta baixo custo com fármacos e por consequência uma melhor qualidade do leite, que não apresentará resíduos de medicamentos (TEODORO et al., 2000; LEDIC et al., 2002). A produção de leite com alta porcentagem de gordura e proteína, é muito apreciada pela indústria de laticínios por apresentar maior rendimento na produção de produtos lácteos como queijos, ricota, creme de leite etc. Além disso, essa raça vem sendo explorada nos programas de melhoramento genético para o aumento da produção do leite tipo A2, que é um leite que possui a proteína beta-caseína A2, e não causa reações em pessoas que possuem alergia a essa proteína específica (TEODORO et al., 2000; LEDIC et al., 2002).

Em razão das características positivas acima relatadas, a raça Gir é a mais utilizada nos sistemas de cruzamento com as raças europeias leiteiras, sendo a raça Girolando, o exemplo de sucesso. O cruzamento entre animais Gir x Holandês na proporção gênica de $3/8$ Gir + $5/8$ Hol, resulta em animais da raça Girolando puros sintéticos, sendo a raça mais usada na pecuária leiteira, pois combina a alta produção de leite e precocidade sexual da raça Holandesa com a rusticidade, resistência e qualidade do leite da raça Gir (SPÍNOLA, 2023). Dessa maneira, fica claro o porquê dessa raça ser a principal dentre as sintéticas, que são responsáveis por cerca 80% do leite produzido no Brasil (GONSALES, 2021). Visto a importância da raça Gir e sua grande expressão nos sistemas leiteiros no Brasil, é importante que melhorias na eficiência produtiva e reprodutiva destes animais continuem sendo obtidas. As características de produção *in vitro* de embriões vêm começando a receber atenção nos programas de melhoramento genético animal, uma vez que buscam valorizar o mérito genético das fêmeas. No entanto, ainda

são poucas as informações coletadas de características relacionadas a produção *in vitro* de embriões em bovinos, à nível de campo, dificultando a realização de estudos a fim de melhor entendê-las, e também aqueles de estimação de parâmetros genéticos e do valor genético para características de produção *in vitro* de embriões.

2.2 Biotecnologias Reprodutivas na Bovinocultura Brasileira: Evolução, Aplicações e Perspectivas na Produção de Embriões

Tendo isso em vista o aumento populacional e de demanda por alimentos (SAATH; FACHINELLO, 2018), surge a necessidade de ferramentas capazes de otimizar a produção de alimentos. Por possuir uma vasta extensão territorial e clima favorável, o Brasil possui grande destaque mundial no agronegócio, o qual representa 25% do PIB brasileiro (CEPEA, 2022), sendo a bovinocultura uma atividade de destaque, já que o Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, ocupando o primeiro lugar na exportação de carne bovina (ABIEC, 2022).

Devido à importância econômica da bovinocultura e como forma ativa de contribuição para atender as demandas futuras por alimentos, vem sendo desenvolvidas ferramentas e tecnologias que aumentam a produtividade e a eficiência nos sistemas de produção de bovinos. As tecnologias de reprodução assistida aliadas aos programas de melhoramento genético desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e disseminação de material genético superior (SILVA et al., 2015), quando feito de maneira correta.

As técnicas de reprodução assistida para produção de embriões começaram a surgir no Brasil na década de 1980 com os primeiros registros de produção de embriões *in vivo*, mostrando grandes avanços, levando o Brasil a apresentar na década de 1990 um mercado de embriões já consolidado (ANDRADE et al., 2012). Através de um projeto financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e empresas privadas, no início de 1990, foram registrados os primeiros nascimentos de embriões produzidos *in vitro*, entretanto, apenas no ano de 1998 que começaram a surgir os primeiros laboratórios comerciais de produção de embriões *in vitro* (ANDRADE et al., 2012).

A utilização das biotécnicas reprodutivas de Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) aliadas à utilização de touros com valores para diferença esperada na progênie (DEP) favoráveis às características de interesse, permitiram o melhor aproveitamento e disseminação dos animais de maior mérito genético nos rebanhos. Porém, com o uso dessas ferramentas, a difusão em grande escala, está restrita à machos geneticamente superiores, implicando em maior pressão de seleção apenas dos touros. Em contrapartida, a fim de aumentar a participação e exploração do potencial genético das fêmeas nos rebanhos, algumas biotécnicas são utilizadas, como a superovulação (SOV) e produção *in vivo* de embriões, aspiração folicular e produção de embriões *in vitro* (PIVE) e transferência de embriões (TE) (SARTORI et al., 2016).

As técnicas de IA e da IATF, pelos seus benefícios já são consolidadas e exploradas em larga escala nos rebanhos de bovinos de corte e de leite. A utilização da produção *in vivo* e/ou *in vitro* de embriões, também auxiliam para o aumento da eficiência reprodutiva nos rebanhos, e quando ambas as técnicas são trabalhadas em conjunto em um programa de melhoramento genético animal, promovem ganhos genéticos mais rápidos, tanto pela disseminação do material genético do macho quanto da fêmea (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Há ainda a possibilidade da utilização do sêmen sexado, em que se aumenta a chance de obtenção do sexo desejado e a promessa da seleção genômica aplicada em embriões através da utilização de marcadores moleculares, que está em fase de estudos (FERRÉ et al., 2020).

2.3 Produção *in vitro* de Embriões

Na produção de embriões *in vivo* a maturação e fecundação dos oócitos ocorrem dentro do trato reprodutivo da fêmea, na produção *in vitro* de embriões (PIVE) esse processo ocorre externamente à doadora. A técnica de reprodução assistida PIVE, consiste na coleta de oócitos de fêmeas doadoras, que pode ser realizada tanto *post mortem* — a partir da punção folicular de ovários provenientes de abatedouros — quanto *in vivo*, por meio de laparoscopia vaginal ou, mais comumente, pela aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). O método mais amplamente utilizado é a recuperação *in vivo* por aspiração folicular guiada por ultrassom, técnica conhecida como Ovum Pick Up (OPU) (ANDRADE et al., 2012). Uma das vantagens dessa abordagem é que ela dispensa o uso de protocolos hormonais para indução da superovulação. Após a coleta, os oócitos são avaliados quanto à qualidade e, em seguida, submetidos aos processos de maturação e fertilização *in vitro* (GADISA; FURGASA; DUGUMA, 2019). Após a fertilização, o zigoto é cultivado por um período de 8 a 9 dias, quando atinge o estágio de blastocisto, pode ser transferido para a receptora ou então congelado para posterior utilização (GADISA; FURGASA; DUGUMA, 2019).

A variação na eficácia da PIVE é notável, e pode depender de diversos fatores, como a idade, manejo nutricional e sanitário da doadora, sazonalidade, laboratório responsável pela coleta e fertilização dos oócitos e fatores genéticos (MERTON et al., 2009; ANDRADE et al., 2012; MELLO et al., 2016; FELTES et al., 2022; FELTES et al., 2024). Durante a realização da PIVE, consegue-se alcançar altas taxas de maturação e de clivagem (80-90%), entretanto a taxa de desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto é baixa ($\pm 30\%$), quando comparada à de embriões produzidos *in vivo*, indicando que as maiores perdas acontecem nesse estágio (MERTON et al., 2003). Normalmente, apenas cerca de 20% a 40% dos oócitos chegam ao estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2008), momento em que serão transferidos para as receptoras ou então criopreservados para posterior transferência.

A produção de embriões *in vitro* vem crescendo cada vez mais, e pela primeira vez, em 2016, o número de embriões produzidos *in vitro* ultrapassou o número de embriões produzidos *in vivo* (INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY - IETS, 2017). O Brasil vem se destacando no cenário mundial de produção de embriões e em 2014 foi responsável pela produção de 70% do total mundial (PERRY, 2014). Esse grande destaque no quantitativo de embriões produzidos no Brasil, deve-se principalmente ao tamanho do rebanho, que é o maior rebanho comercial do mundo (BRAZILIAN BEFF, 2022) e devido a composição genética do rebanho nacional, constituído em sua maioria por animais zebuínos, que quando comparados aos taurinos, produzem maior número de oócitos (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

As vantagens do uso da PIVE são diversas, como o aumento da taxa reprodutiva de fêmeas de alto valor genético, obtenção de descendentes de animais inférteis, de novilhas que ainda não entraram na puberdade, de animais gestantes e lactantes, além da possibilidade de utilização de oócitos de animais de alto valor genético que não são mais capazes de se reproduzir ou até mesmo que já estejam mortos (HASLER; BARFIELD, 2021). No caso de animais inférteis, trata-se de indivíduos que, por razões não genéticas — como lesões reprodutivas adquiridas, problemas anatômicos ou idade avançada —, perderam a capacidade de gerar crias de forma natural, mas ainda produzem oócitos viáveis. Nesses casos, a PIVE se mostra especialmente vantajosa, pois permite o aproveitamento do potencial genético desses indivíduos sem comprometer a saúde ou o desempenho da prole.

Apesar das vantagens e do grande avanço que a PIVE tem tido nas últimas décadas, existem diversos fatores que podem interferir na PIVE, estes podem ser relacionados à fêmea doadora, ao ambiente e também aos procedimentos e profissionais responsáveis pela coleta de oócitos, aos procedimentos realizados posteriormente até a chegada ao estágio de blastocisto,

além de fatores inerentes à receptora e ao touro utilizado na fertilização (ANDRADE et al., 2012; MELLO et al., 2016).

2.4 Características de Qualidade de Oócitos, Produção de Embriões e Prenhez

A qualidade dos oócitos pode ser avaliada morfológicamente, de acordo com a presença das células do *cumulus* que revestem o oócito e de acordo com a homogeneidade ou heterogeneidade do ooplasma da célula, sendo a quantidade e a qualidade dos oócitos influenciados por diversos fatores, como fatores genéticos e não genéticos, como procedimentos envolvendo a OPU e intervalo entre as sessões (MERTON et al., 2003; Merton et. al., 2009).

Ao pensar em qualidade de oócitos, a produção de embriões é um parâmetro mais demorado para ser utilizado como indicador, uma vez que para chegar ao estágio de embrião, o oócito passa por várias etapas, enquanto que a análise da qualidade do oócito, que é feita logo após a fase de coleta seria mais eficiente, já que envolve apenas uma etapa (MERTON et al., 2003; LONERGAN et al., 2006).

Para avaliação da qualidade dos oócitos, é feita uma classificação em grau I, em que há total revestimento do oócito por células do *cumulus* em mais de 3 camadas e ooplasma homogêneo; grau II, em que há presença de células do *cumulus* revestindo o oócito porém em menos de três camadas e o ooplasma começando a ficar heterogêneo; grau III, em que ainda há a presença de células do *cumulus*, entretanto não há revestimento total do oócito e apresenta ooplasma heterogêneo e os oócitos de grau IV, em que há ausência de células do *cumulus* e ooplasma heterogêneo, conhecido como oócito desnudo (MERTON et al., 2003). Já os embriões clivados, são avaliados quanto ao estágio e grau de desenvolvimento de acordo com padrões pré-estabelecidos pela IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

Alguns exemplos de características utilizadas para avaliar qualidade de oócitos e de embriões na literatura são: Ncoc (número de oócitos grau I, II, III e IV que passaram por todas as etapas da PIVE); número de oócitos grau I em relação ao Ncoc; número de embriões clivados no dia 4; número total de embriões no dia 7; número total de embriões transferíveis no dia 7 (MERTON, 2009).

Poucos estudos envolvendo a PIVE são feitos com foco nos fatores genéticos, e os que foram feitos, em sua maioria avaliaram as características de produção de embriões e oócitos. O primeiro trabalho com estimação de parâmetros genéticos para características de qualidade de oócitos apresentou herdabilidade baixa para qualidade de oócito (oócitos grau I = 0,09) e correlação moderada com a porcentagem de embriões produzidos (0,30), indicando ser uma boa opção a ser utilizada na seleção indireta para porcentagem de embriões produzidos, visto que a herdabilidade encontrada para essa característica também foi baixa (0,12) e apesar de a herdabilidade para oócitos grau I ter sido inferior a encontrada para embriões viáveis, esta é uma característica que é medida logo no início do processo de produção *in vitro* diminuindo custos e mão de obra (MERTON et al., 2009).

A última etapa da PIVE envolve a transferência dos embriões produzidos *in vitro* para receptoras, sendo a taxa de prenhez o principal indicador de sucesso do procedimento. No entanto, mesmo com a produção de embriões de boa qualidade, a taxa de prenhez ainda apresenta grande variabilidade em relação ao número de oócitos coletado, e geralmente é inferior à observada com embriões produzidos *in vivo*, variando entre 30% e 45% (HASLER, 2014; FERRAZ et al., 2016). Essa taxa pode ser influenciada por diversos fatores, como a qualidade do embrião no momento da transferência, o tipo de protocolo hormonal utilizado, a receptividade uterina da receptora e as condições ambientais. Fatores genéticos também podem influenciar a taxa de prenhez, uma vez que características como o número de embriões viáveis e a qualidade morfológica dos oócitos apresentam correlações genéticas positivas entre si, variando de 0,30 a 0,72 em animais das raças Holandesa e Gir Leiteiro, respectivamente

(MERTON et al., 2009; VIZONÁ et al., 2020). Esses resultados indicam a possibilidade de também investigar a correlação genética entre essas características com a taxa de prenhez, com o objetivo de realizar seleção indireta para essa característica, que representa o produto final de todo o processo de produção *in vitro* de embriões. Caso essa correlação se confirme como favorável, seria possível selecionar doadoras com base em características mais acessíveis, como qualidade oocitária, visando ganhos indiretos em desempenho embrionário. Dessa forma, a qualidade dos oócitos e o número de embriões viáveis, quando associadas ao potencial genético da doadora, podem impactar diretamente os resultados reprodutivos obtidos por meio da PIVE.

2.5 Componentes Ambientais que Afetam a Qualidade de Oócitos e Produção *in vitro* de Embriões

Em ambiente de elevada temperatura e umidade na criação das doadoras, observou-se queda qualitativa e quantitativa dos oócitos coletados de vacas *Bos taurus*, sendo observado 75,9% de oócitos viáveis durante a estação fria e 41% durante a estação quente, assim diminuindo a taxa desenvolvimento *in vitro* (ROCHA et al., 1998). No entanto, o efeito da temperatura e umidade elevadas não foi observado em vacas *Bos indicus*, as quais apresentaram alto percentual de oócitos coletados, com características morfológicas normais, sem interferências das variações climáticas ocorridas ao longo do ano (ROCHA et al., 1998).

Além do estresse térmico, a sazonalidade também afeta a oferta de alimentos, e por consequente a nutrição animal, em especial quando as fêmeas são mantidas à pasto, uma vez que a quantidade e qualidade da forragem variam de acordo com os efeitos climáticos de cada estação do ano. A nutrição afeta diretamente o desempenho reprodutivo dos bovinos (TORRES; TINEO; RAIDAN, 2015).

Existem algumas técnicas que possibilitam a obtenção de oócitos bovinos, entretanto, a técnica que vem apresentando os melhores resultados para coleta de oócitos na espécie bovina por ser menos invasiva (ANDRADE et al., 2012). A eficiência da OPU está relacionada com a metodologia aplicada, interferindo diretamente na quantidade e qualidade dos oócitos coletados, e consequentemente no desenvolvimento oocitário que ocorrerá posteriormente *in vitro*. Dessa maneira, tem se observado que a frequência de realização da OPU influencia na qualidade e número de embriões transferíveis, sendo observado melhor qualidade e maior número de embriões quando a OPU é realizada de 15 em 15 dias quando comparada a coletas semanais (GIBBONS et al., 1994).

O período reprodutivo de uma vaca pode variar, sendo influenciado por fatores como raça, manejo nutricional, reprodutivo e sanitário (MAGI et al., 2020). Novilhas *Bos taurus indicus* são mais tardias à puberdade, quando comparadas à novilhas *Bos taurus taurus* (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). Entretanto, com a utilização da PIVE, essas novilhas podem ser aspiradas antes de entrar na puberdade, uma vez que já tem sua reserva de folículos definida durante o período de vida uterina (BELTRAN; PANSANI, 2009).

Diante disso, torna-se viável a utilização de doadoras pré-púberes para coleta de oócitos, uma vez que aumenta a vida útil da vaca na reprodução, aumentando também o ganho genético, sendo de grande valia em programas de melhoramento genético (LANDRY et al., 2018), no entanto, animais muito jovens, quando comparados aos animais púberes, apresentam pior desempenho reprodutivo e pior qualidade de oócitos coletados (LANDRY et al., 2016). Isso, provavelmente se deve ao fato desses animais ainda não possuírem plena produção dos hormônios ligados à reprodução (SANDRA BERNAL et al., 2011).

Quando atingem idade adulta e com pelo menos uma gestação, apresentam aumento quantitativo e qualitativo do número de oócitos coletados por aspiração quando comparadas à vacas mais jovens e novilhas (JIN et al., 2016; DU et al., 2024). Porém, com o avançar da idade (≥ 15 anos) o desempenho dessas vacas vai diminuindo, sendo coletados menor número de oócitos por aspiração e de pior qualidade em comparação às vacas mais jovens (12 meses de

idade) e de meia idade (7-8 anos), essa queda seria causada pela mudança no perfil hormonal que ocorre com o avançar da idade (SU et al., 2012).

2.6 Componente Genético da Produção de Embriões *in vitro*

Além dos fatores ambientais que afetam a qualidade de oócitos e embriões, pesquisas mostram que existe um componente genético relacionado às características envolvidas na PIVE, o qual é importante na seleção e nos programas de melhoramento genético que buscam melhorias genéticas para as características relacionadas a PIVE (MERTON et al., 2009; PEREZ et al., 2016; CORNELISSEN et al., 2017; FELTES et al., 2022).

Merton et al. (2009) estimaram parâmetros genéticos para características de qualidade de oócitos e embriões produzidos *in vitro*, em que obtiveram resultados de herdabilidade que variaram de 0,07 à 0,25 e correlação genética favorável moderada de 0,09 à 0,30 entre número de células do cumulus e número de embriões clivados e viáveis.

Adicionalmente, outros estudos estimaram herdabilidades que variaram de 0,03 à 0,34 para a característica de produção de embriões viáveis (TONHATI; LÔBO; OLIVEIRA, 1999; ASADA; TERAWAKI, 2002; KÖNIG et al., 2007; VIZONÁ et al., 2020). Acrescentando a isso, foram encontradas estimativas de repetibilidade que variaram de 0,13 à 0,56 para características de produção de embriões (TONHATI; LÔBO; OLIVEIRA, 1999; ASADA; TERAWAKI, 2002; JATON et al., 2016; VIZONÁ et al., 2020). Conforme evidenciado por esses resultados, é esperado que a seleção para características relacionadas à PIVE, poderia acarretar em progresso genético para essas características, já que as magnitudes dos valores de herdabilidade relatadas na literatura variam de baixas à moderadas.

Entretanto, essas características podem estar correlacionadas geneticamente com outras características produtivas e reprodutivas importantes, como observado por VIZONÁ et al. (2020) que encontraram correlações genéticas baixas ou próximas de zero entre características de PIVE e características como produção de leite, idade ao primeiro parto e características de conformação em animais da raça Gir, como por exemplo a correlação genética de -0,25 entre número de oócitos viáveis e produção de leite. Do mesmo modo, Perez et al. (2016) observaram correlações desfavoráveis de baixa magnitude, em animais da raça Guzerá. Indicando que, apesar das correlações desfavoráveis entre as características, a seleção é possível, entretanto deve ser feita com cautela para não prejudicar o progresso genético já obtido para as características já consolidadas como critério de seleção, como produção de leite e idade ao primeiro parto (VIZONÁ et al., 2020).

As características PIVE, ao serem incluídas como critério de seleção em programas de melhoramento, podem aprimorar o desempenho da PIVE, trazendo maior retorno financeiro, visto que foram estimadas herdabilidades de baixa a moderada para essas características (MERTON et al., 2009; VIZONÁ et al., 2020).

2.7 Referências Bibliográficas

- ABCGIL – Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro. *Gir Leiteiro em pastagem* [imagem digital]. Disponível em: <https://www.girleiteiro.org.br/imagens/conteudo/2396.jpg>. Acesso em: 20 jun. 2025.
- ANDRADE, G. A et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, 2012.
- ASADA, Y.; TERAWAKI, Y. Heritability and Repeatability of Superovulatory Responses in Holstein Population in Hokkaido, Japan. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 7, p. 944–948, 1 jan. 2002.

- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. Xvii, 2007.
- BELTRAN, M. P.; PANSANI, M. A. Anatomia E Fisiologia Do Aparelho Reprodutor De Fêmeas Bovinas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.
- BRAZILIAN BEFF; ABIEC. BEEF REPORT Perfil da Pecuária no Brasil 2022. **Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents**, v. 7, n. 2, 2022.
- CEPEA. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB Agro CEPEA**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>>.
- CORNELISSEN, M. A. M. C. et al. Estimating variance components and breeding values for number of oocytes and number of embryos in dairy cattle using a single-step genomic evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4698–4705, jun. 2017.
- DU, Yinyan et al. Effects of donor age and reproductive history on developmental potential of ovum pickup oocytes in Japanese Black cattle (Wagyu). **Theriogenology**, v. 221, p. 25-30, 2024.
- FELTES, Giovanni Luis et al. Genetic evaluation of oocyte and embryo production in dairy Gir cattle using repeatability and random regression models. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, p. e20220017, 2022.
- Feltes, G. L., Negri, R., Raidan, F. S. S., Viana, A. F. P., Feres, L. F. R., Ribeiro, V. M. P., & Cobuci, J. A. (2024). Impact of heat stress on genetic evaluation of oocyte and embryo
- FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 1 maio 2020.
- GADISA, M.; FURGASA, W.; DUGUMA, M. Review on Embryo Transfer and It's Application in Animal Production. **Asian Journal of Medical Science Research & Review**, v. 01, n. 01, 2019.
- GIBBONS, J. R. et al. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, n. 3, p. 405–419, jan. 1994.
- GONSALES, Stephanie Alves. Girolando: produção de leite, características e história. MilkPoint, 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/raca-girolando-historia-caracteristicas-e-producao-224447/>. Acesso em: 28 jun. 2023.
- HASLER, J. F.; BARFIELD, J. P. *In vitro* Fertilization. Em: **Bovine Reproduction**. [s.l.] Wiley, 2021. p. 1124–1141.
- INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY - IETS. **2016 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals Embryo Transfer Newsletter**. [s.l: s.n.].
- JAINUDEEN, M.; HAFEZ, E. Diagnóstico de gestação. **Reprodução Animal**, 2004.
- JATON, C. et al. Short communication: Genetic correlations between number of embryos produced using in vivo and *in vitro* techniques in heifer and cow donors. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8222–8226, out. 2016.
- JIN, J.-I. et al. Interaction of donor age, parity and repeated recovery of cumulus–oocyte complexes by ovum pick-up on *in vitro* embryo production and viability after transfer. **Livestock Science**, v. 188, p. 43–47, jun. 2016.

- LANDRY, D. A. et al. Effect of cow age on the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1240–1246, set. 2016.
- LANDRY, D. A. et al. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**, v. 156, n. 3, p. 239–248, set. 2018.
- LEDIC, I. L. et al. Estimativa de parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientes para as produções de leite no dia do controle e em 305 dias de lactação de vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, 2002.
- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, 2006.
- MAGI, L. H. R. et al. Efeito de diferentes métodos de indução à puberdade sobre a resposta reprodutiva em novilhas nelore. **Nativa**, v. 8, n. 5, p. 658–662, 27 out. 2020.
- MELLO, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58–54, 2016.
- MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651–674, jan. 2003.
- MERTON, J. S. et al. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–*in vitro* production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885–893, out. 2009.
- PANETTO, J. C. C.; SILVA, M. V. G. B.; VERNEQUE, R. S.; MACHADO, M. A.; FERNANDES, A. R.; MARTINS, M. F.; FAZA, D. R. L. R.; ARBEX, W. A.; OLIVEIRA, J. C.; VENTURA, H. T.; PEREIRA, M. A. **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro Sumário Brasileiro de Touros**. Juiz de Fora, Minas Gerais: Embrapa, 2019.
- PEREZ, B. C. et al. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- PERRY, G. **2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals**. Embryo Transfer Newsletter. **Anais...**2014.
- RIZOS, D. et al. Consequences of *In vitro* Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s4, p. 44–50, 17 out. 2008.
- ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in but not in cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657–665, fev. 1998.
- SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, jun. 2018.
- SANDRA BERNAL, U. et al. Effect of age and coasting period on oocytes quality and their *in vitro* development from prepubertal cattle. **Revista MVZ Cordoba**, v. 16, n. 2, 2011.
- SANTOS, R. **O Gir e o leite na pecuária fundamental**. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical, 2007. 456 p.
- SARTORI, R. et al. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.
- SILVA, A. P. T. B. DA et al. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 72, n. 1, p. 51–58, 31 jan. 2015.
- SPÍNOLA, Paula. Gir Leiteiro é o zebuino com maior produtividade leiteira. Canal Rural, 2023. Disponível em: . Acesso em: 28 jun. 2023.

- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Procedures**. 3rd Edition. Savory, IL: International Embryo Transfer Society, 1998.
- SU, L. et al. Effect of Donor Age on the Developmental Competence of Bovine Oocytes Retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184–189, abr. 2012.
- TEODORO, R. L. et al. Estudo de Características do Sistema Mamário e suas Relações com a Produção de Leite em Vacas da Raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, 2000.
- TONHATI, H.; LÔBO, R. B.; OLIVEIRA, H. N. Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1151–1156, abr. 1999.
- TORRES, H. L.; TINEO, J. O.; RAIDAN, F. 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, 16 set. 2015.
- VARAGO, F. C.; MENDOÇA, L.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, 2008.
- VIZONÁ, R. G. et al. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, 2020.

3 CAPÍTULO I

FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NA RAÇA GIR

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os fatores que influenciam a produção *in vitro* de embriões na raça Gir em um programa comercial de transferência de embriões no Brasil. Foram analisados dados de 15.894 aspirações foliculares realizadas em 3.682 doadoras da raça Gir leiteiro, sendo avaliados o número médio de oócitos viáveis por doadora (VON), a proporção de oócitos viáveis (VOP), a taxa de blastocistos (BLR) e a taxa de prenhez (PR). Inicialmente, os registros de coleta foram distribuídos entre as estações do ano, e os resultados mostraram que a VOP foi maior no verão (75,0%) e na primavera (74,1%), enquanto a BLR foi mais alta na primavera (22,5%). Em seguida, as doadoras foram agrupadas em sete classes etárias, nas quais os maiores valores de VOP foram observados nos animais de 6 a 8 anos (76,3%), 8 a 10 anos (76,0%) e 10 a 12 anos (76,0%). Em relação à BLR, os maiores valores foram observados em doadoras com mais de 4 anos. As doadoras também foram agrupadas em novilhas e vacas, sendo que as vacas apresentaram maior BLR (22,42%) em comparação às novilhas (20,05%). Posteriormente, avaliou-se o efeito das estações do ano sobre a PR após a transferência de embriões a fresco, sendo a primavera (43,8%) e o inverno (43,5%) as estações com maiores taxas. Por fim, compararam-se as taxas de prenhez após a transferência de embriões a fresco ou vitrificados, observando-se maior PR para embriões a fresco (41,1%) em relação aos vitrificados (34,6%). Portanto, a estação do ano, assim como a idade e a categoria das doadoras da raça Gir, influenciam a produção *in vitro*. Além disso, a vitrificação reduz a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* da raça Gir leiteiro.

Palavras-chave: aspiração folicular; criopreservação; idade do animal.

ENVIRONMENTAL FACTORS INFLUENCE *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION OF GIR CATTLE

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the factors influencing *in vitro* embryo production in the Gir breed in a commercial embryo transfer program in Brazil. Data from 15,894 follicular aspirations in 3,682 Gir dairy donors were analyzed and the average number of viable oocytes per donor (VON), proportion of viable oocytes (VOP), blastocyst rate (BLR), and pregnancy rate (PR) were evaluated. First, the collection records were distributed across the seasons, and the results showed that VOP was higher in summer (75.0%) and spring (74.1%), while BLR was higher in spring (22.5%). The donors were subsequently grouped into seven age classes, in which the highest VOP was observed in animals aged 6-8 years (75.2%), 8-10 years (75.7%), and 10-12 years (75.9%). Regarding the BLR, the highest values were observed in donors older than 4 years. Donors were also grouped as heifers or cows, with cows (22.42%) showing a higher BLR than heifers (20.05%). Next, the effect of seasons on PR after fresh embryo transfer was evaluated, with spring (43.8%) and winter (43.5%) presenting the highest PR. Finally, pregnancy rates were compared following the transfer of fresh or vitrified embryos, showing a higher PR for fresh embryos (41.1%) than for vitrified ones (34.6%). Therefore, season, as well as the age and category of Gir donors, influence *in vitro* production. Additionally, vitrification reduces the survival of *in vitro*-produced Gir dairy embryos.

Key-words: animal age; cryopreservation; ovum pick-up.

3.1 Introdução

A crescente demanda por maior produtividade na pecuária tem estimulado a busca por ferramentas que aprimorem o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, especialmente bovinos. Nesse contexto, ao longo dos anos, diversas biotecnologias reprodutivas foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar o número de descendentes por indivíduo, destacando-se, entre elas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferência embrionária (PARKER GADDIS et al., 2017).

Apesar dos grandes avanços na técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE), ainda é observada uma baixa porcentagem de oócitos que atingem o estágio de blastocisto quando comparada à produção *in vivo*, com taxas em torno de 20 a 40% (RIZOS et. al., 2008). Esses valores podem ser afetados por três principais fatores: profissional/técnico, ambiental/biológico e animal. Fatores técnicos que influenciam o sucesso dos procedimentos de aspiração folicular guiada por ultrassom (ovum pick-up [OPU]) incluem a pressão utilizada na bomba de aspiração, a frequência do equipamento de ultrassom, o tipo de agulha utilizada e a experiência do técnico responsável pelo procedimento. Fatores biológicos podem incluir idade, raça, ciclo estral, e as condições nutricionais e sanitárias das doadoras, sendo que o ambiente e as condições climáticas também são responsáveis por influenciar o estado biológico das fêmeas (ANDRADE et. al., 2012; MELLO et. al., 2016; FELTES et. al. 2024). O fator animal refere-se ao componente genético de cada indivíduo, o qual é utilizado na seleção genética daqueles animais com maior mérito genético aditivo para características relacionadas à PIVE (PEREZ et. al., 2016; VIZONÁ et. al., 2020; FELTES et. al., 2022).

Com o uso crescente de embriões produzidos *in vitro* (HASLER, 2014), também tem aumentado o número de estudos comparando as taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco ou vitrificados com aquelas obtidas por inseminação artificial (HASLER et. al., 1995; DROST et. al., 1999; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008; STEWART et. al., 2011; FERRAZ et. al., 2016; CROWE et. al., 2024). Embora diversos estudos importantes já tenham sido realizados em raças *Bos indicus*, a maior parte das pesquisas disponíveis concentra-se em raças taurinas. Portanto, ainda são necessários mais estudos que avaliem esses efeitos em raças zebuínas, amplamente utilizadas na pecuária brasileira.

Outro ponto a ser considerado para o maior sucesso da técnica são as condições climáticas, uma vez que o estresse térmico tem demonstrado exercer influência negativa sobre essa característica em bovinos leiteiros taurinos (DEMÉTRIO et. al., 2007; VIEIRA et. al., 2014), sendo também necessário estudar a influência do estresse térmico em bovinos zebuínos, que são animais mais adaptados a climas quentes.

Diante do exposto, avaliar os fatores que afetam a PIVE e a transferência de embriões pode contribuir para melhorar as taxas de sucesso dessas técnicas no campo. Assim, os objetivos deste estudo retrospectivo foram: avaliar os fatores ambientais e das doadoras que podem influenciar a quantidade, qualidade e capacidade de desenvolvimento dos oócitos coletados de fêmeas da raça Gir leiteiro, e avaliar os fatores ambientais e o tipo de transferência (embriões frescos ou vitrificados) que podem afetar a taxa de prenhez após a transferência de embriões.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Descrição dos dados

O banco de dados inicial continha 15.894 registros de aspiração folicular (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) de 3.682 doadoras da raça Gir, nascidas entre 1993 e 2019, com idades variando de 7 a 251 meses, provenientes de quatro propriedades localizadas no estado de Minas Gerais, Brasil (19°55' S e 43°57' O), com coletas realizadas entre os anos de 2005 e 2020. O sêmen utilizado na produção *in vitro* era de origem comercial, proveniente das raças Gir e Holandesa. A região é caracterizada por clima subtropical, com variação sazonal de temperatura (mínima a máxima, em °C) de 21,1–31,9 °C no verão, 18,9–28,9 °C no outono, 15,2–27,0 °C no inverno e 18,8–29,9 °C na primavera (INMET, 2025). As estações do ano foram classificadas como: verão (dezembro a fevereiro), outono (março a maio), inverno (junho a agosto) e primavera (setembro a novembro).

3.2.2 Recuperação de oócitos, produção *in vitro* de embriões e vitrificação

A OPU e a PIVE foram realizadas por um laboratório comercial, seguindo seus procedimentos operacionais padrão. Resumidamente, a OPU foi realizada por um único técnico em um dia aleatório do ciclo estral, sem qualquer estimulação hormonal. Todos os folículos visíveis foram aspirados usando uma agulha de calibre 20G com uma pressão de vácuo equivalente a uma taxa de aspiração de 12 mL/min. Os ovócitos imaturos recuperados foram avaliados morfológicamente com base no número de camadas de células do cúmulo que os circundam e na aparência do citoplasma, e foram classificados em graus I, II, III e IV, conforme descrito por de Loos et al. (1989). Os complexos cumulus-oócitos (COCs) viáveis (GI, GII e GIII) foram transportados para o laboratório em tubos contendo meio de maturação (Hepes-buffered TCM 199, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), 50 UI/mL de hCG (Sigma C-1063), 0,5 µg/mL de LH (Vetoquinol Saúde Animal, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), 1 µg/mL de estradiol (Sigma E-8875), 2,2 µg/mL de FSH (Folltropin), 0,2 mM de piruvato (Sigma P-4562) e 70 µg/mL de amicacina (Sigma A-2324). O transporte foi realizado em uma incubadora portátil (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) a 38,6 °C. A maturação *in vitro* (MIV) durou 22 horas, incluindo o tempo de transporte. O sêmen de touros Gir com desempenho de PIVE conhecido foi processado por centrifugação através de um gradiente de Percoll (45% e 90%) e ajustado para uma concentração final de $1,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL na gota de fertilização. Os COCs maturados foram co-incubados com espermatozoides em meio TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina (Sigma H-3149) e uma mistura de PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina; 10 µL/mL) por 18 horas a 39 °C e 5% de CO₂, sob óleo mineral a 38,5 °C. Os zigotos presumíveis foram desnudados por pipetagem suave e repetida e, em seguida, cultivados em gotas de 50 µL de fluido oviductal sintético modificado (SOFaa) sob atmosfera umidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ por seis dias. O meio foi renovado 72 horas após a inseminação, e a formação de blastocistos foi avaliada no 7º dia (168 horas após a inseminação). A taxa de blastocistos foi calculada com base no número de oócitos coletados. No laboratório comercial, a temperatura foi rigorosamente regulada e todas as etapas do processo de produção de embriões *in vitro* foram realizadas em temperatura ambiente controlada de 22 a 24 °C.

Os procedimentos utilizados para a vitrificação de embriões foram adaptados do estudo de González-Rodríguez et al. (2022). Resumidamente, os embriões foram inicialmente equilibrados por pelo menos 1 hora em meio de espera (HM: meio TCM199 tamponado com HEPES e suplementado com 20% de soro fetal bovino) à temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões foram incubados em uma solução de equilíbrio (ES: 7,5% (v/v) de etilenoglicol (EG) e 7,5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) em HM) por 10 minutos. Os embriões foram então transferidos para uma gota de 100 µL de solução de vitrificação (VS:

15% (v/v) de EG, 15% (v/v) de DMSO e 0,5 M de sacarose dissolvida em HM), seguido por uma segunda gota de 100 μ L de VS. Após a incubação por um total de 30 segundos em cada microgota de VS, os embriões individuais foram carregados em uma palheta aberta (OPS) usando ação capilar. Imediatamente após, o OPS foi rapidamente mergulhado em nitrogênio líquido (LN2). Os dispositivos OPS foram então selados com um canudo protetor. Todo o processo, desde a exposição à solução de vitrificação até a imersão em LN2, levou aproximadamente 1 minuto. Os dispositivos OPS foram armazenados em LN2 até o uso posterior.

3.2.3 Características analisadas

As características avaliadas foram: número de oócitos coletados (TON), média de oócitos coletados ($VON = TON/n$), taxa de oócitos viáveis ($VOP = VO/TON$), taxa de clivagem ($CLR = CLE/TON$), número médio de embriões viáveis ($VEN = VE/n$), taxa de blastocisto ($BLR = VE/TON$), número de embriões transferidos (EMBN) e taxa de prenhez ($PR = PRN/EMBN$), em que VON é o número médio de oócitos coletados, n é o número de aspirações foliculares, VO é o número de oócitos viáveis, CLE é o número de embriões clivados, VE é o número de embriões viáveis que atingiram o estágio de blastocisto e PRN é o número de embriões transferidos que resultaram em diagnóstico positivo de prenhez. Para as análises, o banco de dados passou por controle de qualidade, sendo excluídos os registros com TON igual a zero, TON menor que o número total de oócitos viáveis, TON menor que CLE, CLE menor que o número total de embriões viáveis, registros com data de coleta anterior à data de nascimento da doadora, e registros de anos com poucos dados. Ressalta-se que, para EMBN e PRN, também foram excluídos os registros em que EMBN era igual a zero, pois eram situações em que não houve nenhuma transferência, logo zero embriões transferidos.

3.2.4 Modelo estatístico e transformação dos dados

Como as características analisadas referem-se a contagens e proporções, elas podem não apresentar distribuição normal dos resíduos. Para atender às premissas de normalidade exigidas pelo modelo linear misto, foram aplicadas transformações nas variáveis: transformação logarítmica ($\log_{10}[x + 1,001]$) para as características VON e EMBN, e transformação arco seno da raiz quadrada ($\arcsen\sqrt{x}$) para as características VOP, TCL, TBL e PR, sendo x a variável em sua escala original.

Neste estudo, utilizou-se o modelo linear misto com distribuição Gaussiana ajustado às variáveis transformadas.

3.2.5 Análises experimentais

Análise 1: Efeito das estações do ano sobre a produção e competência oocitária

Na avaliação do efeito das estações do ano, foram criadas quatro classes conforme a estação no momento da aspiração folicular (OPU), com número total de registros semelhantes: primavera ($n = 3.685$), verão ($n = 3.677$), outono ($n = 3.893$) e inverno ($n = 3.587$) (Tabela 1).

Análise 2: Efeito da idade e da categoria da doadora sobre a competência oocitária

O efeito da idade das doadoras no momento da aspiração folicular foi avaliado agrupando-se os animais nas seguintes faixas etárias: de 0 a 2 anos, de 2 a 4 anos, de 4 a 6 anos, de 6 a 8 anos, de 8 a 10 anos, de 10 a 12 anos e acima de 12 anos (Tabela 2).

Além disso, foi avaliado o efeito da categoria das doadoras — vacas ou novilhas — no momento da OPU, sendo consideradas novilhas aquelas que ainda não haviam parido, e vacas aquelas que já haviam tido pelo menos um parto (Tabela 3). Como o banco de dados continha registros repetidos ao longo da vida reprodutiva das fêmeas, uma mesma doadora poderia aparecer em ambas as categorias. Dessa forma, a classificação foi realizada com base na idade ao primeiro parto de cada animal.

Análise 3: Efeito da estação do ano sobre a taxa de prenhez após a transferência de embriões à fresco

Para analisar o efeito da estação do ano sobre a taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco, os registros foram agrupados conforme a estação no momento da OPU. Como o banco de dados não continha a data exata da transferência, considerou-se a data de coleta dos oócitos como referência, uma vez que o intervalo entre a coleta, maturação, fertilização e desenvolvimento *in vitro* é de aproximadamente 10 dias (SEIDEL; SEIDEL, 1991). As observações foram organizadas nas estações primavera (n = 2.014), verão (n = 1.875), outono (n = 1.871) e inverno (n = 1.831) (Tabela 4).

Para embriões transferidos após o descongelamento, não foi possível testar o efeito da estação do ano, uma vez que não havia informação disponível sobre a data da transferência no banco de dados.

Análise 4: Efeito da vitrificação embrionária sobre a taxa de prenhez

O objetivo desta análise foi verificar se a vitrificação de embriões influencia negativamente a taxa de prenhez em comparação à transferência de embriões a fresco. Para isso, os registros foram separados em dois grupos: embriões transferidos a fresco (n = 8.448) e embriões previamente vitrificados e descongelados antes da transferência (n = 886) (Tabela 5).

3.2.6 Modelo estatístico

A análise de variância foi realizada utilizando-se um modelo linear misto com medidas repetidas ao longo do tempo, que considerou os efeitos fixos destacados nas diferentes análises experimentais descritas anteriormente, e o efeito aleatório dos animais (doadoras). As análises foram conduzidas no software R (R CORE TEAM, 2022), utilizando os pacotes lme4 (BATES et al., 2015) e lmerTest (KUZNETSOVA; BROCKHOFF; CHRISTENSEN, 2017).

O teste de Tukey para comparação de médias para as análises que avaliaram os efeitos das classes etárias e das estações do ano foi realizado por meio do pacote emmeans (LENTH, 2023), também no R.

O seguinte modelo estatístico foi utilizado para avaliar o efeito das estações do ano e das classes de idade sobre as características relacionadas ao desenvolvimento dos oócitos:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + AR_k + e_{ijkl},$$

em que Y_{ijkl} é o valor do registro fenotípico das características VON, VOP, CLR, VEN ou BLR; μ é uma constante comum a todas as observações; A_i é o efeito fixo da i -ésima classe de estação ($i = 4$); B_j é o efeito fixo da j -ésima classe de idade do doador ($j = 1, \dots, 7$); AR_k é o efeito aleatório do animal; e e_{ijkl} é o erro aleatório associado a cada observação.

Para avaliar o efeito da categoria da doadora (novilha ou vaca) sobre as características de desenvolvimento oocitário (VON, VOP, CLR, VEN e BLR), o efeito das estações do ano sobre a taxa de prenhez (PR) de embriões transferidos a fresco, e o efeito da vitrificação (embriões a fresco ou vitrificados) sobre a taxa de prenhez, utilizou-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + AR_j + e_{ijk},$$

em que Y_{ijk} é o valor do registro de observação das características VON, VOP, CLR, VEN, BLR ou PR; A_i é o efeito fixo [categoria da doadora ($i = 1$ e 2) nas características VON, VOP, CLR, VEN ou BLR, ou efeito fixo da estação ($i = 4$) no PR de embriões transferidos frescos, ou efeito fixo da vitrificação ($i = 1$ e 2) no PR], em que cada efeito fixo foi avaliado exclusivamente para todas as características; AR_j é o efeito aleatório do animal; e e_{ijk} é o erro aleatório associado a cada observação.

3.3 Resultados

Análise 1

O número médio de oócitos recuperados por doadora foi significativamente maior no verão (23,10 oócitos) e no outono (23,13 oócitos) em comparação com a primavera (21,44 oócitos), conforme mostrado na Tabela 1. Esse padrão de distribuição entre as estações não se repetiu na proporção de oócitos viáveis, já que os maiores valores foram registrados no verão (75,00) e na primavera (74,10). Quanto às taxas de clivagem, após a fertilização *in vitro* dos oócitos, os maiores valores foram observados para oócitos coletados no inverno (58,69%) e na primavera (58,46%), com o pior desempenho no verão (54,01%). Não houve diferença significativa no número médio de embriões viáveis entre as estações do ano ($p > 0,05$). No entanto, as maiores taxas de blastocisto foram observadas para oócitos coletados na primavera (22,45%).

Análise 2

O número médio de oócitos coletados por doadora por sessão de OPU foi significativamente maior para os grupos etários de 0-2 anos (27,82), 2-4 anos (25,40) e 4-6 anos (22,42), enquanto as menores produções foram observadas nos doadores dos grupos etários de 10-12 anos (18,37) e acima de 12 anos (14,59). As idades que apresentaram as maiores taxas de oócitos viáveis foram as dos doadores com 6-8 anos (76,32%), 8-10 anos (75,99%) e 10-12 anos (75,98%), porém sem diferença significativa entre elas ($p > 0,05$). As maiores taxas de clivagem foram obtidas a partir dos oócitos coletados de doadores com mais de 4 anos. Em contrapartida, taxas de clivagem significativamente menores foram observadas em oócitos recuperados de doadoras com 2-4 anos (55,00%). O maior número médio de embriões viáveis foi observado em doadoras com idade entre 4-6 anos (5,09 oócitos) e 0-2 anos (4,87 oócitos). As maiores taxas de blastocisto foram observadas em doadoras coletadas nas idades de 4-6 anos (22,20%), 6-8 anos (21,59%), 8-10 anos (21,50%), 10-12 anos (20,00%) e acima de 12 anos (19,21%), sem diferença estatística entre esses valores ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Vale destacar que análises adicionais considerando a interação entre os efeitos de estação do ano e idade das doadoras mostraram que existe uma interação complexa entre esses fatores (dados não apresentados). Ou seja, para todas as características avaliadas, o efeito da idade da doadora pode variar, ainda que minimamente, entre as diferentes estações.

Não houve efeito significativo da categoria da doadora (novilha versus vaca) sobre o número médio de oócitos coletados por aspiração (Tabela 3). O maior número médio de embriões viáveis foi observado nas vacas (4,81). Entretanto, as taxas de oócitos viáveis (73,37%) e de blastocisto (22,42%) foram maiores nas vacas, enquanto a taxa de clivagem foi maior nas novilhas (59,37%).

Análise 3

A estação do ano no momento da transferência de embriões a fresco influenciou significativamente a taxa de prenhez (Tabela 4). As maiores taxas foram observadas nas transferências realizadas na primavera (43,84%) e no inverno (43,47%), enquanto as menores ocorreram no verão (38,02%) e no outono (38,58%).

Análise 4

O efeito da vitrificação sobre a taxa de prenhez foi avaliado por meio da comparação entre embriões transferidos a fresco e embriões que passaram pelo processo de vitrificação e descongelamento. A transferência de embriões a fresco resultou em maior taxa de prenhez (41,10%) em comparação com os embriões vitrificados (34,55%) (Tabela 5).

Tabela 1: Efeito de diferentes estações do ano na produção e competência de ovócitos coletados de doadoras Gir.

Estação	n	TON	VON	Média ± Desvio Padrão			
				VOP (%)	CLR (%)	VEN	BLR (%)
Primavera	3,685	78,999	21.44 ± 15.71 ^c	74.10 ± 16.08 ^{ab}	58.46 ± 19.34 ^a	4,81 ± 4,68 ^{NS}	22.45 ± 17.06 ^a
Verão	3,677	84,954	23.10 ± 15.89 ^{ab}	75.00 ± 15.06 ^a	54.01 ± 19.00 ^c	4,72 ± 4,68 ^{NS}	20.50 ± 16.47 ^b
Outono	3,893	90,046	23.13 ± 16.04 ^a	73.10 ± 16.03 ^c	55.54 ± 19.42 ^b	4,71 ± 4,49 ^{NS}	20.36 ± 16.28 ^b
Inverno	3,587	81,821	22.81 ± 15.46 ^b	73.72 ± 15.03 ^{bc}	58.69 ± 19.00 ^a	4,78 ± 4,67 ^{NS}	20.95 ± 17.05 ^b

n: número de coletas; TON: número total de oócitos coletados; VON: número médio de oócitos coletados por aspiração; VOP: taxa de oócitos viáveis; CLR: taxa de clivagem; VEN: número médio de embriões viáveis por aspiração; BLR: taxa de blastocisto. a,b,c Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05).

Tabela 2: Efeito da classe etária do doador na produção e competência de oócitos coletados de doadoras Gir.

Doadora Idade (anos)	n	TON	VON	Média ± Desvio padrão			
				VOP (%)	CLR (%)	VEN	BLR (%)
0 – 2	1,036	28,819	27.82 ± 18.75 ^a	70.80 ± 17.14 ^d	55.10 ± 19.18 ^{bc}	4,87 ± 4,59 ^{ab}	16,90 ± 14.92 ^c
2 – 4	4,246	107,853	25.40 ± 17.25 ^a	72.61 ± 16.40 ^c	55,00 ± 19.26 ^c	4,74 ± 4,93 ^b	18.41 ± 15.56 ^{bc}
4 – 6	4,679	104,889	22.42 ± 15.22 ^a	74,90 ± 15.42 ^b	57,00 ± 19.26 ^{ab}	5,09 ± 4,64 ^a	22.20 ± 17.04 ^a
6 – 8	2,642	53,547	20.27 ± 13.29 ^b	76,32 ± 15.32 ^a	57,21 ± 18.57 ^{ab}	4,78 ± 4,38 ^b	21,59 ± 17.06 ^a
8 – 10	1,236	23,699	19.17 ± 13.53 ^{bc}	75,99 ± 14.63 ^{ab}	58,10 ± 19.93 ^a	4,33 ± 4,25 ^c	21,50 ± 17.54 ^a
10 – 12	630	11,571	18.37 ± 14.27 ^{cd}	75,98 ± 16.01 ^{ab}	58,90 ± 19.60 ^a	3,81 ± 4,28 ^d	20.00 ± 18.34 ^{ab}
> 12	373	5,442	14.59 ± 11.20 ^d	71.91 ± 17.03 ^{cd}	57,60 ± 20.44 ^{ab}	3,08 ± 3,89 ^d	19,21 ± 17.79 ^{abc}

n: número de coletas; TON: número total de oócitos coletados; VON: número médio de oócitos coletados; VOP: taxa de oócitos viáveis; CLR: taxa de clivagem; VEN: número médio de embriões viáveis por aspiração; BLR: taxa de blastocisto. a,b,c,d Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05).

Tabela 3: Efeito da categoria do doador na produção e competência de desenvolvimento de oócitos coletados de doadores da raça Gir.

Categoria	n	TON	VON	Média ± Desvio Padrão			
				VOP (%)	CLR (%)	VEN	BLR (%)
Novilha	1,425	30,101	21.12 ± 14.90	67.67 ± 18.31 ^b	59.37 ± 19.14 ^a	4,23 ± 4,41 ^b	20.05 ± 16.22 ^b
Vaca	9,181	19,7507	21.51 ± 15.30	73.37 ± 15.73 ^a	57.54 ± 19.37 ^b	4,81 ± 4,59 ^a	22.42 ± 17.19 ^a

n: número de coletas; TON: número total de oócitos coletados; VON: número médio de oócitos coletados; VOP: taxa de oócitos viáveis; CLR: taxa de clivagem; VEN: número médio de embriões viáveis por aspiração; BLR: taxa de blastocistos. a,b Valores seguidos pela mesma letra na mesma

Tabela 4: Efeito da estação no momento da transferência de embriões na taxa de prenhez de receptoras que receberam embriões produzidos *in vitro* e transferidos frescos.

Estação	EMBN	Média ± Desvio padrão
		PR (%)
Primavera	8,957	43.84 ± 34.48 ^a
Verão	8,643	38.02 ± 39.20 ^b
Outono	8,042	38.58 ± 35.49 ^b
Inverno	8,957	43.47 ± 34.20 ^a

EMBN: número total de embriões transferidos; RP: taxa de prenhez. a,b Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 5: Efeito da criopreservação de embriões na taxa de prenhez de receptoras que receberam embriões produzidos *in vitro*, vitrificados ou transferidos frescos.

Tipo de transferência	EMBN	Média ± Desvio padrão
		PR (%)
Fresco	40,661	41.10 ± 33.74 ^a
Vitrificado	3,669	34.55 ± 35.32 ^b

EMBN: número total de embriões transferidos; RP: taxa de prenhez. a,b Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

3.4 Discussão

A maior parte das pesquisas tem se concentrado em avaliar o impacto da estação do ano sobre as taxas de clivagem e blastocisto em raças taurinas, sem abordar diretamente como a estação influencia o desenvolvimento embrionário após a transferência. Além disso, embora alguns estudos tenham investigado o efeito da criopreservação em embriões de raças zebuínas, a literatura disponível ainda é limitada. Especificamente, estudos que avaliem o efeito da vitrificação de embriões produzidos *in vitro* a partir de doadoras da raça Gir ainda são escassos, o que ressalta a necessidade de mais pesquisas nessa área.

Efeito da estação do ano sobre a produção e competência oocitária:

A variação sazonal tem impacto significativo sobre o desempenho reprodutivo de doadoras da raça Gir (*Bos indicus*), especialmente no que diz respeito à recuperação de oócitos e à produção *in vitro* de embriões (PIVE). Neste estudo, o menor número médio de oócitos recuperados por doadora foi observado durante a primavera, sugerindo um possível comprometimento do desenvolvimento folicular ou da população de folículos antrais nessa estação. Isso pode estar relacionado a alterações fotoperiódicas, adaptações metabólicas à transição de estação e efeitos fisiológicos associados ao fim do período seco no Brasil.

Apesar da menor produção de oócitos, tanto a primavera quanto o verão apresentaram as maiores taxas de oócitos viáveis, indicando uma possível compensação pela melhora na qualidade dos oócitos. Esses achados são consistentes com relatos anteriores que sugerem que, embora o estresse térmico durante o verão possa aumentar a atresia folicular, ele pode não afetar negativamente a competência dos ovócitos que atingem o estágio de metáfase II após a maturação *in vitro* (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). O número médio de embriões viáveis (VEN) por doadora não apresentou variação sazonal significativa (Tabela 1), indicando produção embrionária estável, apesar das flutuações na produção e competência dos ovócitos. Esse achado contrasta com os observados em raças taurinas, nas quais há redução na viabilidade dos oócitos durante as estações mais quentes, sugerindo maior susceptibilidade ao estresse térmico. Isso evidencia uma vantagem adaptativa das raças zebuínas, como o Gir, para programas reprodutivos conduzidos em ambientes tropicais (ROCHA et al., 1998).

Os efeitos sazonais também foram evidentes na competência pós-fertilização. As maiores taxas de clivagem foram observadas quando os oócitos foram coletados no inverno e na primavera, sendo que a primavera também apresentou a maior taxa de blastocisto. Esses resultados sugerem que, embora a quantidade de oócitos seja reduzida na primavera, sua competência para o desenvolvimento é aumentada, possivelmente devido a perfis hormonais favoráveis ou a um ambiente folicular mais propício associado à transição do fotoperíodo (GORDON, 2003). A elevação da taxa de blastocisto na primavera reforça a hipótese de que a qualidade dos oócitos — refletida em aspectos como função mitocondrial e maturação citoplasmática — é um fator determinante para o sucesso da PIVE, podendo ser mais relevante que a quantidade de oócitos (LONERGAN et al., 2006). De modo geral, esses achados ressaltam a importância de considerar a sazonalidade nas biotecnologias reprodutivas bovinas e indicam a primavera como uma estação promissora para a coleta de oócitos com alta competência de desenvolvimento em doadoras Gir.

Efeito da idade e da categoria da doadora sobre a competência oocitária:

De forma geral, observou-se que a idade da doadora exerce papel relevante sobre a competência dos oócitos. O número de oócitos coletados foi maior em animais mais jovens, como também relatado em estudo com animais da cruz Murray Grey × Brahman, nos quais a maior produção foi observada em fêmeas com até um ano de idade (SU et al., 2012). No entanto, as maiores taxas de clivagem e de blastocisto foram observadas em doadoras entre 4 e 12 anos

e naquelas que já haviam parido (categoria vaca) e o maior número de embriões viáveis foi observado em doadoras de 4 a 6 anos (5,09), 0 a 2 anos (4,87) e em vacas (4,81), esses resultados estão em consonância com estudos anteriores conduzidos em raças como Nelore (DE SILVA et al., 2022) e Wagyu (DU et al., 2024).

Isso sugere que, além da idade, a maturidade fisiológica e o histórico reprodutivo da doadora afetam a qualidade e a capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Conforme relatado por Du et al. (2024), em doadoras Wagyu, oócitos coletados após o primeiro parto apresentam melhor competência, provavelmente devido a mudanças fisiológicas como o aumento do tamanho corporal e ovariano, tornando os ovários mais sensíveis à ação do FSH (DE SILVA et al., 2022; IRELAND et al., 2010). Assim, os dados indicam que, mesmo com o avanço da idade e a esperada redução da reserva folicular, a competência dos oócitos de vacas entre 10 e 12 anos permanece semelhante à de fêmeas mais jovens (4–6 anos), sugerindo que o declínio na qualidade oocitária pode não ocorrer antes da idade média de descarte das vacas (ALVAREZ et al., 2021).

A menor competência observada nos oócitos de animais jovens tem sido atribuída a deficiências na síntese proteica (LEVESQUE; SIRARD, 1994), à maturação ooplasmática incompleta (DAMIANI et al., 1996), à baixa responsividade a hormônios ou fatores de crescimento (KHATIR et al., 1997) e à menor reserva de glicose intracelular (WARZYCH et al., 2017), elementos que comprometem a qualidade e o desenvolvimento embrionário.

Dessa forma, os resultados reforçam a importância da idade e da categoria reprodutiva como fatores determinantes da competência oocitária. Animais mais jovens tendem a produzir maior quantidade de oócitos, porém com menor competência, ao passo que vacas com histórico de parto apresentam melhores taxas de desenvolvimento embrionário. Isto é ainda apoiado pelos valores de VEN, que foram mais elevados nas vacas do que nas novilhas e atingiram o pico nas doadoras com idades entre os 4 e os 6 anos (5,09), destacando esta faixa etária como particularmente promissora para os programas de PIVE. Isso sugere que programas de PIVE devem considerar não apenas a idade cronológica, mas também a maturidade fisiológica e o histórico produtivo das doadoras, permitindo uma abordagem mais estratégica e eficiente.

Efeito da estação sobre a taxa de prenhez:

A taxa de prenhez foi maior nas transferências realizadas durante a primavera (43,84%) e o inverno (43,47%) em comparação com o verão (38,02%) e o outono (38,58%) (Tabela 4). Essa variação pode ser explicada pelo estresse térmico e nutricional enfrentado pelos animais durante os meses mais quentes do ano. Além disso, considerando que os sistemas de produção leiteira no Brasil são majoritariamente extensivos, a qualidade das pastagens — diretamente influenciada pelas condições climáticas — pode afetar negativamente a ingestão e o estado nutricional dos animais, especialmente durante o verão, quando há redução na ingestão de alimento em resposta ao calor.

Consequentemente, no verão, caracterizado por altas temperaturas, observou-se uma diminuição na taxa de prenhez. Essa queda pode estar associada ao estresse térmico sofrido pelas receptoras, as quais, na maioria dos sistemas brasileiros de produção, são vacas Girolando — mestiças originadas do cruzamento entre as raças Holandesa e Gir. A fração genética da raça Holandesa, menos adaptada ao calor, pode reduzir a resistência ao estresse térmico, o que não ocorre nas doadoras puras da raça Gir. Esse efeito pode ainda se prolongar para os meses seguintes, o que explicaria o desempenho semelhante observado no outono. Estudos anteriores indicam que os efeitos do estresse térmico sobre o desenvolvimento folicular e a fertilidade podem persistir mesmo após o término da exposição direta ao calor (ROTH et al., 2000; GENDELMAN et al., 2010).

Nosso estudo mostrou que a estação de coleta dos oócitos exerce grande impacto sobre os resultados da taxa de prenhez após transferência de embriões produzidos *in vitro*. Isso aponta

a estação do ano como um possível indicativo estratégico para a escolha dos melhores períodos de coleta, assim como para o desenvolvimento de medidas de mitigação dos efeitos sazonais sobre a sobrevivência embrionária após a PIVE. Além disso, ressalta-se a importância de investigar se a interação entre a sazonalidade e os métodos de criopreservação afeta significativamente os resultados reprodutivos. Caso essa influência se confirme, seria possível concentrar coletas durante as estações mais favoráveis (como primavera e inverno), com vistas à criopreservação de embriões de maior qualidade, garantindo sua disponibilidade ao longo do ano.

Efeito da vitrificação sobre a taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro*:

Os resultados indicam que a criopreservação por vitrificação tem impacto negativo sobre a taxa de prenhez, quando comparada à transferência de embriões a fresco (Tabela 5). Esse achado evidencia que a principal limitação do uso da criopreservação reside nos resultados insatisfatórios associados à criossensibilidade dos embriões produzidos *in vitro*. Essa maior sensibilidade resulta em significativa redução da sobrevivência embrionária após o descongelamento (KAIDI et al., 2001; SANCHES et al., 2018; FERRÉ et al., 2020).

A redução na viabilidade embrionária após a criopreservação tem sido associada a alterações no metabolismo dos embriões, sobretudo em sua atividade mitocondrial (ALMIÑANA; CUELLO, 2015; KURZELLA et al., 2024). Embriões de menor qualidade apresentam menor tolerância aos processos de congelamento, e essa qualidade está diretamente relacionada à origem e ao ambiente de desenvolvimento embrionário. Durante o cultivo *in vitro*, por exemplo, o acúmulo de lipídios, induzido pelo meio de cultura, tem sido apontado como fator que aumenta a criossensibilidade (KUMAR et al., 2022; MARSICO et al., 2019). Além disso, alterações no perfil bioenergético das mitocôndrias podem comprometer ainda mais a sobrevivência após o descongelamento, tanto em protocolos de congelamento lento quanto na vitrificação (KURZELLA et al., 2024).

Esses achados reforçam a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de PIVE e criopreservação, buscando estratégias que aumentem a tolerância dos embriões ao congelamento e, consequentemente, a taxa de sucesso na transferência. Apesar de ser uma ferramenta essencial para o armazenamento de material genético de alto valor e uso reprodutivo posterior, a criopreservação ainda apresenta desafios consideráveis. O impacto negativo sobre a viabilidade embrionária, ligado às alterações metabólicas e ao acúmulo de lipídios, destaca a urgência em desenvolver protocolos que minimizem esses efeitos e tornem a produção e transferência de embriões mais eficiente em larga escala (FANG et al., 2014).

3.5 Conclusões

Este estudo identificou que a estação do ano em que os oócitos são coletados, bem como a idade e a categoria da doadora, influenciam significativamente a competência oocitária em fêmeas da raça Gir leiteiro. Além disso, observou-se que a taxa de prenhez de embriões transferidos a fresco é impactada pela estação do ano, enquanto a criopreservação por vitrificação reduz a taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

Esses achados indicam que, para otimizar os resultados em programas de produção *in vitro* de embriões, é fundamental considerar não apenas a idade cronológica, mas também o histórico reprodutivo das doadoras, permitindo uma seleção mais estratégica. Além disso, os resultados reforçam a importância de identificar os períodos mais adequados para a realização das coletas, assim como a necessidade de melhorias técnicas e metodológicas que minimizem os efeitos da sazonalidade sobre a sobrevivência embrionária pós-PIVE.

3.6 Referências Bibliográficas

- ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos? **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 418–427, 2015.
- ALVAREZ, R. H. et al. Antral follicle count, oocyte production and embryonic developmental competence of senescent Nellore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 174, p. 27–35, 2021.
- ANDRADE, G. A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 66–69, 2012.
- BATES, Douglas et al. *lme4: Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4*. 2015. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>. Acesso em: 27 jun. 2025.
- CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 98–106, 2008.
- CROWE, A. D. et al. Fertility in seasonal-calving pasture-based lactating dairy cows following timed artificial insemination or timed embryo transfer with fresh or frozen *in vitro*–produced embryos. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 3, p. 1788–1804, 2024.
- DAMIANI, P. et al. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 521–534, 1996.
- DE LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 197–204, 1989.
- DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1139–1151, 2003.
- DE SILVA, M. O. et al. Effect of Nellore (*Bos indicus*) donor age on in-vitro embryo production and pregnancy rate. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 9, p. 980–988, 2022.
- DEMÉTRIO, D. G. B. et al. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073–5082, 2007.
- DROST, M. et al. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1161–1167, 1999.
- DU, Y. et al. Effects of donor age and reproductive history on developmental potential of ovum pickup oocytes in Japanese Black cattle (Wagyu). **Theriogenology**, v. 221, p. 25–30, 2024.
- FANG, Y. et al. Developmental competence *in vitro* and in vivo of bovine IVF blastocyst after 15 years of vitrification. **CryoLetters**, v. 35, n. 3, p. 232–238, 2014.
- Feltes, G. L., Negri, R., Raidan, F. S. S., Viana, A. F. P., Feres, L. F. R., Ribeiro, V. M. P., & Cobuci, J. A. (2024). Impact of heat stress on genetic evaluation of oocyte and embryo

- FELTES, G. L.; NEGRI, R.; RAIDAN, F. S. S.; FERES, L. F. R.; RIBEIRO, V. M. P.; COBUCI, J. A. Genetic evaluation of oocyte and embryo production in dairy Gir cattle using repeatability and random regression models. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, e20220017, 2022.
- FERRÉ, L. B. et al. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 6, p. 659–676, 2020.
- FERRAZ, P. A. et al. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1834–1841, 2016.
- GADDIS, K. P. et al. Evaluation of genetic components in traits related to superovulation, *in vitro* fertilization, and embryo transfer in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2877–2891, 2017.
- GENDELMAN, M. et al. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 73–82, 2010.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. 548 p.
- HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152–169, 2014.
- HASLER, J. F. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141–152, 1995.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa – BDMEP. Brasília: INMET, 2025. Disponível em: <<https://bdmep.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 27 abr. 2025.
- IRELAND, J. J. et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2010.
- KAIDI, S. et al. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1127–1134, 2001.
- KHATIR, H. et al. Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. **Reproduction**, v. 111, n. 2, p. 267–275, 1997.
- KUMAR, S. et al. Factors affecting the cryopreservation of oocytes and embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e25111427337, 2022.
- KURZELLA, J. et al. Mitochondrial bioenergetic profiles of warmed bovine blastocysts are typically altered after cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 214, p. 21–32, 2024.
- KUZNETSOVA, Alexandra; BROCKHOFF, Per Bruun; CHRISTENSEN, Rune Haubo Bojesen. *lmerTest package: Tests in linear mixed effects models*. *Journal of Statistical Software*, v. 82, n. 13, p. 1–26, 2017. DOI: 10.18637/jss.v082.i13.
- LENTH, Russell V. *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. 2024. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- LEVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 2, p. 133–139, 1994.

- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 2006.
- MARSICO, T. V. et al. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 423–439, 2019.
- MELLO, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 58–64, 2016.
- PARKER GADDIS, K. L. et al. Evaluation of genetic components in traits related to superovulation, *in vitro* fertilization, and embryo transfer in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2877–2891, 2017.
- PEREZ, B. C. et al. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022.
- RIZOS, D. et al. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, suppl. 2, p. 44–50, 2008.
- ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657–665, 1998.
- ROTH, Z. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 1, p. 83–90, 2000.
- SANCHES, B. V. et al. Cryopreservation of *in vitro*-produced embryos: challenges for commercial implementation. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 521–527, 2018.
- SEIDEL, G. E.; SEIDEL, S. M. Training manual for embryo transfer in cattle. Rome: FAO, 1991. v. 77.
- STEWART, B. M. et al. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3437–3445, 2011.
- SU, L. et al. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184–189, 2012.
- VIEIRA, L. M. et al. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 204–212, 2014.
- VIZONÁ, R. G. et al. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, p. 27–32, 2020.
- WARZYCH, E. et al. Interactions of bovine oocytes with follicular elements with respect to lipid metabolism. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 10, p. 1491–1497, 2017.

4 CAPÍTULO II

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE OÓCITOS, PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E PREENHEZ NA RAÇA GIR LEITEIRO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estimar parâmetros genéticos para características morfológicas de oócitos, produção *in vitro* de embriões e taxa de prenhez em fêmeas Gir Leiteiro. Foram utilizados 16.806 registros de aspiração folicular (OPU) de 4.071 doadoras, coletados entre 2005 e 2024 em seis rebanhos de Minas Gerais. Foram analisadas características de produção de oócitos (número e porcentagem de oócitos viáveis (OV, POV) e seus graus morfológicos de qualidade (G1, G2, G3 e respectivas proporções)); de produção *in vitro* de embriões viáveis (número e porcentagem de embriões viáveis (EV, PEV)); e de prenhez (número e taxa de prenhez (PR, PPR)). As características de contagem passaram por transformação logarítmica (OV, G1, G2, G3, EV e PR) e as de porcentagem por transformação arcossênica (POV, PG1, PG2, PG3, PEV e PPR). Para as características de produção de embriões e prenhez, foram testados diferentes modelos, um utilizando o touro como efeito fixo, e outro com o touro como efeito aleatório, entretanto não houve diferença significativa entre os modelos, adotando-se o touro como efeito fixo no modelo. Os componentes de variância para estas características e os valores genéticos dos animais (VGs) foram estimados utilizando um modelo unicaracter, e as covariâncias utilizando um modelo bicaracter, sendo ambos modelos animais de repetibilidade, nos quais foi adotado o método de máxima verossimilhança restrita, com o uso do software AIREMLF90 para a obtenção das variâncias e covariâncias e o BLUPF90 para a predição dos VGs. As estimativas de herdabilidade para as características de produção de oócitos variaram de $0,05 \pm 0,01$ (PG1) a $0,42 \pm 0,03$ (OV), e de repetibilidade de $0,05 \pm 0,01$ (PG1) a $0,56 \pm 0,01$ (OV), sendo os maiores valores observados para características expressas em contagem. Para produção de embriões (EV e PEV), as herdabilidades foram, respectivamente $0,18 \pm 0,03$ e $0,11 \pm 0,02$, enquanto para taxa de prenhez os valores foram mais baixos: $0,02 \pm 0,01$ (PPR) e $0,10 \pm 0,02$ (PR). Apenas a correlação de Spearman entre os valores genéticos de OV e G3 apresentou valor alto (0,93), tanto para machos quanto para fêmeas. A tendência genética mostrou aumento nos valores genéticos ao longo dos anos para OV, EV e PR, mesmo sem existência de seleção sobre estas características, sugerindo ganhos indiretos por meio da seleção de outras características correlacionadas a elas. As correlações genéticas e fenotípicas indicaram que a seleção para OV pode impactar positivamente EV e PR, reforçando o potencial de ganhos simultâneos. Conclui-se que há variabilidade genética significativa para proceder a seleção para as características ligadas à PIVE na raça Gir Leiteiro, principalmente naquelas expressas na forma de contagem, OV e G3. A inclusão dessas características nos programas de avaliação genética pode melhorar a eficiência reprodutiva dos animais para a produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: *Bos indicus*; Herdabilidade; oócitos grau I.

GENETIC PARAMETERS FOR OOCYTE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION AND PREGNANCY IN THE GIR DAIRY BREED

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate genetic parameters for oocyte morphological characteristics, *in vitro* embryo production and pregnancy rate in Gir Leiteiro dams. A total of 16,806 follicular aspiration (OPU) records from 4,071 donors, collected between 2005 and 2024 in six herds in Minas Gerais-Brazil, were used. The following characteristics were analyzed: oocyte production (number and percentage of viable oocytes (OV, POV) and their morphological quality grades (G1, G2, G3 and respective proportions)); *in vitro* viable embryo production (number and percentage of viable embryos (EV, PEV)); and pregnancy (number and pregnancy rate (PR, PPR)). The counting traits underwent logarithmic transformation (OV, G1, G2, G3, EV and PR) and the percentage traits underwent arcsenic transformation (POV, PG1, PG2, PG3, PEV and PPR). For the embryo production and pregnancy traits, different models were tested, one using the bull as a fixed effect, and another with the bull as a random effect. However, there was no significant difference between the models, adopting the bull as a fixed effect in the model. The variance components for these traits and the genetic values of the animals (VGs) were estimated using a unitrait model, and the covariances using a bitrait model, both being animal models of repeatability, in which the restricted maximum likelihood method was adopted, using the AIREMLF90 software to obtain the variances and covariances and the BLUPF90 to predict the VGs. The heritability estimates for oocyte production traits ranged from 0.05 ± 0.01 (PG1) to 0.42 ± 0.03 (OV), and repeatability from 0.05 ± 0.01 (PG1) to 0.56 ± 0.01 (OV), with the highest values observed for traits expressed in counts. For embryo production (EV and PEV), the heritabilities were, respectively, 0.18 ± 0.03 and 0.11 ± 0.02 , while for pregnancy rate the values were lower: 0.02 ± 0.01 (PPR) and 0.10 ± 0.02 (PR). Only the Spearman correlation between the genetic values of OV and G3 showed a high value (0.93), for both males and females. The genetic trend showed an increase in genetic values over the years for OV, EV and PR, even without selection on these traits, suggesting indirect gains through selection of other traits correlated with them. Genetic and phenotypic correlations indicated that selection for OV can positively impact EV and PR, reinforcing the potential for simultaneous gains. It is concluded that there is significant genetic variability to proceed with selection for traits linked to PIVE in the Gir Leiteiro breed, mainly those expressed in the form of count, OV and G3. The inclusion of these traits in genetic evaluation programs can improve the reproductive efficiency of animals for *in vitro* embryo production.

Key-words: *Bos indicus*; Heritability; oocytes quality.

4.1 Introdução

A crescente demanda por maior produtividade na pecuária tem estimulado a busca por ferramentas que potencializem o desempenho reprodutivo dos animais, especialmente em bovinos. Com isso, diversas biotecnologias foram sendo desenvolvidas para aumentar o número de descendentes por indivíduos e consequentemente a disseminação mais intensiva de material genético superior. Dentre essas ferramentas destacam-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferências de embriões (TE) (PARKER GADDIS et. al., 2017). Sendo inicialmente aplicada com maior frequência na bovinocultura de corte, e com o aumento na utilização de sêmen sexado, também passou a ser mais utilizada na bovinocultura de leite (VIANA et. al., 2012).

No Brasil, a raça zebuína Gir Leiteiro desempenha um papel fundamental na pecuária leiteira, sendo amplamente empregada tanto como base para a reposição de fêmeas da própria raça (VIANA et al., 2017; SILVA et al., 2018), quanto como raça materna nos cruzamentos com a raça Holandesa, resultando em diferentes composições genética do Girolando. Estima-se que animais provenientes de cruzamentos sejam responsáveis por aproximadamente 80% da produção nacional de leite, tendo o Girolando se consolidado a principal raça composta utilizada nesse sistema produtivo (GUIMARÃES et al., 2006; CANAZA-CAYO et al., 2019). Nesse cenário, a PIVE se apresenta como uma opção, já que permite o uso intensivo de fêmeas e machos geneticamente superiores aumentando assim o ganho genético e a eficiência reprodutiva. Além disso, a PIVE auxilia na manutenção do grau de heterose sem a necessidade de manter um touro taurino no rebanho, que são mais difíceis de manter em certas localidades por conta da sua menor resistência ao clima tropical (SARTORI et. al., 2010).

O sucesso e eficiência na PIVE dependem de diversos fatores já relatados na literatura, como nutrição da doadora (SALES et. al., 2015), estresse térmico (BARUSELLI et. al., 2012; FELTES et. al., 2024), qualidade do oócito (MERTON et. al., 2009) entre outros fatores não genéticos, sendo a maioria dos estudos publicados relacionados os fatores não genéticos. Entretanto, nas últimas duas décadas, surgiram estudos investigando a influência de fatores genéticos nas características de produção *in vitro* (MACHADO et. al., 2006; MERTON et. al., 2009; PEREZ et. al., 2016; JATON et. al., 2016, VIZONÁ et. al., 2020; FELTES et. al., 2022).

De acordo com Merton (2009), a qualidade do complexo cumulus-oócitos (COCs) tem grande influência no sucesso da biotécnica reprodutiva. A qualidade e quantidade do COCs sofrem influência de diversos fatores, como estresse térmico (FELTES et. al., 2024) fatores nutricionais e de estado fisiológico da doadora (ANDRADE et al., 2012; MELLO et al., 2016), e inclusive fatores genéticos (MERTON et. al., 2003; VIZONÁ et. al., 2020). Apesar da influência dos componentes genéticos em características de PIVE ser confirmada, ainda são escassos estudos explorando esse assunto, e ainda mais aqueles que avaliaram as características morfológicas dos oócitos coletados e de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

A classificação morfológica dos oócitos é feita de acordo com o número de células do cumulus e aparência citoplasmática, em que os oócitos podem ser classificados em Grau I, II, III (oócitos viáveis) ou IV (sem células do cumulus), sendo Grau I os oócitos de maior qualidade (LONERGAN, 1992). Merton et al. (2009) e Vizoná et al. (2020) estimaram parâmetros genéticos para características PIVE, incluindo para oócitos de grau I, observando valores de herdabilidade que variaram de 0,01 a 0,18. No entanto, ainda são necessários estudos para estimar parâmetros genéticos para oócitos de grau II e III e taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro* em raças leiteiras. Em bovinos de corte, foram encontradas herdabilidades de 0,02 e 0,15 para animais das raças Senepol e Nelore, respectivamente, para a característica taxa de prenhez (PINHEIRO et al., 2024). Na PIVE, a taxa de prenhez representa um importante indicador da eficiência do processo, da viabilidade embrionária e do retorno financeiro, uma vez que os custos de produção de embriões e da manutenção de receptoras são justificados por taxas de prenhez satisfatórias.

Com o intuito de possibilitar aumentar a eficiência genética do uso da PIVE, o objetivo deste trabalho é estimar parâmetros genéticos e predizer valores genéticos para características morfológicas dos oócitos (graus I, II e III) coletados de doadoras da raça Gir Leiteiro, bem como para características embrionárias e a taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro*. Adicionalmente, busca-se estimar as correlações genéticas e fenotípicas entre essas características, de modo a identificar possíveis associações favoráveis ou desfavoráveis que possam orientar estratégias de seleção mais eficientes no contexto da produção *in vitro* de embriões na raça.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Descrição dos dados

O conjunto inicial de dados analisado nesse estudo continha informação de 16.806 registros de aspirações foliculares (OPU) referente a 4.071 doadoras Gir Leiteiro. Os procedimentos de aspiração folicular foram realizados em seis rebanhos localizados no estado brasileiro de Minas Gerais – Brasil (19°55' S e 43°57' W) e ocorreram entre março de 2005 e outubro de 2024. A região é caracterizada por um clima subtropical, com variações sazonais de temperatura (mínima a máxima, em °C) de 21,1–31,9 °C no verão, 18,9–28,9 °C no outono, 15,2–27,0 °C no inverno e 18,8–29,9 °C na primavera. As estações do ano foram classificadas como verão (dezembro a fevereiro), outono (março a maio), inverno (junho a agosto) e primavera (setembro a novembro) (INMET, 2025).

As doadoras possuíam idades entre 7 e 251 meses no momento OPU, sendo que para a fertilização *in vitro* foi utilizado o sêmen comercial de 240 diferentes touros (Gir e Holandês). O arquivo de pedigree utilizado apresentou 10.330 indivíduos, destes 3.588 eram doadoras, filhas de 334 touros e 1.908 vacas.

4.2.2 Características analisadas

Foram analisadas características de produção de oócitos como Número (OV) e porcentagem (POV) de oócitos viáveis; Número (G1) e porcentagem (PG1) de oócitos grau 1; Número (G2) e porcentagem (PG2) de oócitos grau 2; Número (G3) e porcentagem (PG3) de oócitos grau 3; de produção *in vitro* de embriões: Número (EV) e porcentagem (PEV) de embriões viáveis; e prenhez de embriões produzidos *in vitro* em Número (PR) e porcentagem (PPR). As características percentuais POV, PG1, PG2 e PG3 foram obtidas em relação ao número total de oócitos coletados (OT). A PEV foi calculada em relação ao número de oócitos viáveis (OV) e PPR em relação ao número de embriões transferidos.

Para a realização das análises o banco de dados passou por controle de qualidade, sendo excluídos os registros que apresentaram OT igual a 0; OT menor que OV; OT e OV menor que G1, G2 ou G3; OT menor que EV; OV menor que EV; registros com data de coleta antes da data de nascimento da doadora, assim como registros em anos e fazendas com poucas observações. Ressalta-se que para as análises das características PR e PPR também foram excluídos os registros em que o número total de embriões transferidos era igual a 0, uma vez que os resultados para essas características dependem diretamente do número de embriões transferidos, logo no banco de dados zero embriões transferidos indicam que não houve transferência de embriões o que resultaria em zero na prenhez, não sendo um resultado, apenas uma informação.

4.2.3 Transformação dos dados

As características avaliadas são referentes a contagens repetidas no tempo e porcentagens, portanto, para atender os pressupostos de normalidade de um modelo linear misto, as transformações aplicadas às características avaliadas foram: logarítmica ($\log_{10}[x+1,001]$), sendo aplicadas às características OV, G1, G2, G3, EV e PR e arco seno ($\arcsin\sqrt{x}$), aplicadas às características POV, PG1, PG2, PG3, PEV e PPR, em que x se refere a característica em sua escala original antes das transformações.

4.2.4 Análise estatística

Os componentes de variância e os valores genéticos (VGs) foram obtidos por meio de um modelo unicaracter, enquanto as covariâncias foram estimadas utilizando um modelo bicaracter. As análises foram realizadas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), com uso dos softwares AIREMLF90, para obtenção das variâncias e covariâncias, e

BLUPF90, para predição dos VGs (MISZTAL et al., 2002). Todas as análises foram conduzidas utilizando um modelo animal com medidas repetidas.

Para as características de produção de oócitos (OV, POV, G1, PG1, G2, PG2, G3 e PG3) o modelo adotado foi:

$$Y_{ijklmno} = HY_i + season_j + classOPU_l + intOPU_m + a_n + p_o + e_{ijklmno}$$

Em que, $Y_{ijklmno}$ são os valores fenotípicos das características transformadas; HY_i é o efeito fixo de rebanho-ano de coleta ($i = 36$ para OV, POV, G1, PG1, G2, PG2, G3 e PG3); $season_j$ é o efeito fixo da estação de coleta ($j =$ verão, outono, inverno ou primavera); $classOPU_l$ é o efeito fixo das classes do número de coletas por animal (classe 1 = apenas uma coleta, classe 2 = 2 a 3 coletas, classe 3 = 4 a 5 coletas, classe 4 = 6 a 8 coletas, classe 5 = 9 a 11 coletas, classe 6 = 12 a 17 coletas, classe 7 = 18 a 32 coletas e classe 8 = 33 ou mais coletas); $intOPU_m$ é o efeito fixo da classe do intervalo entre coletas (1 = primeira OPU; 2 = 1 a 6 dias entre as OPU; 3 = 7 a 14 dias; 4 = 15 a 21 dias; 5 = 21 a 30 dias; e 6 = mais de 30 dias entre as OPU); a_n é o efeito aleatório do animal ($n = 10.330$); p_o é o efeito aleatório de ambiente permanente; e $e_{ijklmno}$ é o efeito aleatório residual.

Em notação matricial, o modelo para as características de produção de oócitos é representado por:

$$y = Xb + Z_1u + Z_2pe + e$$

Em que y é o vetor das características transformadas; b é o vetor de efeitos fixos; u é o vetor dos efeitos genéticos aditivos de animal; pe é o vetor de efeitos aleatórios de ambiente permanente; e é o vetor de efeitos aleatórios residuais; e X , Z_1 e Z_2 as matrizes de incidência relacionando registros aos efeitos fixos e aleatórios.

Assume-se que:

$$\begin{matrix} u & A\sigma_u^2 & 0 & 0 \\ var [pe] = [& 0 & I\sigma_{pe}^2 & 0] \\ e & 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{matrix}$$

Em que: u é a variância genética aditiva, A é a matriz de parentesco; pe é a variância dos efeitos permanentes da doadora para a qual a I é a matriz de identidade e e é a variância residual.

Para as características de produção de embriões (EV e PEV) e prenhez (PR e PPR), além dos efeitos fixos e aleatórios citados no modelo acima, considerou-se também o efeito linear e quadrático da covariável de idade da doadora na OPU, em meses e o efeito fixo do touro utilizado na inseminação ($n = 240$).

4.2.5 Estimação de parâmetros genéticos

A herdabilidade (h^2) e a repetibilidade (r) para as características de produção de oócitos, produção de embriões e prenhez foram estimadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2} ; r = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2}$$

Em que σ_a^2 , σ_{pe}^2 e σ_e^2 são as variâncias genética aditiva, de ambiente permanente, e do resíduo, respectivamente.

A correlação genética aditiva entre as características foi calculada com base nas (co)variâncias estimadas, da seguinte forma:

$$r_a = \frac{cov_{a,xy}}{\sigma_{a,x} \sigma_{a,y}}$$

Onde $cov_{a,xy}$ é a covariância genética aditiva entre as características x e y; $\sigma_{a,x}$ e $\sigma_{a,y}$ são o desvios-padrão genético aditivo da característica x e y, respectivamente.

A correlação fenotípica (r_p) entre as características x e y, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula descrita por Merton et. al (2009):

$$r_p = \frac{cov_{a,xy} + cov_{c,xy} + cov_{e,xy}}{(\sigma_{a,x} + \sigma_{c,x} + \sigma_{e,x})(\sigma_{a,y} + \sigma_{c,y} + \sigma_{e,y})}$$

Em que $cov_{c,xy}$ e $cov_{e,xy}$ são, respectivamente, a covariância de ambiente permanente e a covariância residual entre as características x e y, enquanto $\sigma_{c,x}$ e $\sigma_{e,x}$ são os desvios-padrão de ambiente permanente e do resíduo da característica x, e $\sigma_{c,y}$ e $\sigma_{e,y}$ são os desvios-padrão do ambiente permanente e do resíduo da característica y.

4.2.6 Correlação de Spearman

Para verificar a ocorrência de possíveis mudanças na classificação dos touros pelos valores genéticos dos animais preditos para as diferentes características avaliadas, foi calculada a correlação de *Spearman* considerando 5% dos touros com os maiores valores genéticos estimados (EBV) e 20% das melhores fêmeas.

4.2.7 Tendência genética

Para avaliar as tendências genéticas das características analisadas foi realizada regressão linear dos valores genéticos estimados (EBV) das diferentes características em função do ano de nascimento das doadoras. A tendência genética foi estimada a partir das médias anuais dos EBVs, considerando apenas doadoras nascidas entre 1997 e 2019. A equação de regressão linear adotada foi:

$$y = b_0 + Xb,$$

Onde y representa o EBV da doadora, b_0 é o intercepto, X corresponde ao ano de nascimento das doadoras e b é o coeficiente de regressão a ser estimado.

4.3 Resultados

4.3.1 Estatística descritiva

De modo geral, observou-se ampla variação nos valores médios e seus respectivos desvios padrão de todas as características (Tabela 1), indicando uma alta dispersão dos registros fenotípicos coletados para características de produção de oócitos, produção *in vitro* de embriões e prenhez.

Tabela 1: Número de observações (N), mediana, média, desvio padrão, máximo e mínimo para as características de produção de oócitos, produção *in vitro* de embriões e prenhez (variáveis não transformadas), em doadoras Gir Leiteiro.

Características	N	Mediana	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
OV	16806	14,00	16,98	13,01	1	143
POV	16806	76,67	73,90	15,78	12,5	100
G1	16806	0	0,85	1,50	0	11
PG1	16806	0	3,76	6,86	0	100
G2	16806	1,00	1,90	2,41	0	23
PG2	16806	6,67	8,96	10,61	0	100
G3	16806	11,00	14,22	11,64	0	137
PG3	16806	63,33	61,18	18,56	0	100
EV	15303	3,00	4,53	4,57	0	43
PEV	15303	18,75	20,99	17,12	0	100
PR	9586	1,00	1,98	2,22	0	17
PPR	9586	40	40,74	33,95	0	100

OV: número de oócitos viáveis; POV: Porcentagem de oócitos viáveis; G1, G2 e G3: número de oócitos grau I, II e III, respectivamente; PG1, PG2 e PG3: porcentagem de oócitos grau I, II e III, respectivamente; EV: número de embriões produzidos; PEV: Porcentagem de embriões produzidos; PR: número de prenhez; PPR: taxa de prenhez.

O número OV, G1, G2 e G3 apresentaram valores médios de 16,98, 0,85, 1,90 e 14,92, respectivamente; e com elevados valores de desvio padrão, os quais variaram de 13,01 (OV) a 1,50 (G1). Comportamento semelhante foi observado para as características em porcentagem. Observa-se que para G1 e G2, os valores médios foram mais baixos, quando comparados à G3.

A média de embriões viáveis foi de $4,53 \pm 4,57$ por doadora, o que corresponde a uma porcentagem de $20,99 \pm 17,12$ de embriões viáveis em relação ao número de oócitos viáveis (PEV). Já o número médio de prenhez (PR) foi de $1,98 \pm 2,22$ por doadora, com porcentagem média de prenhez de $40,74 \pm 33,95$ em relação ao número de embriões transferidos. O desvio padrão novamente apresentou-se valores elevados para essas características, refletindo diferenças expressivas entre as doadoras quanto à produção e porcentagem de embriões viáveis e a taxa de prenhez.

A análise descritiva dos dados revela alta variabilidade na produção total de embriões viáveis (EV), evidenciada pelo maior valor do desvio padrão (4,57) em relação à média (4,53). Essa variabilidade se estende também à eficiência de conversão em gestações, com taxa percentual ampla e desvio padrão considerável ($PPR = 40,74 \pm 33,95$).

4.3.2 Parâmetros genéticos

A tabela 2 apresenta as estimativas de variância genética aditiva (σ_a^2), variância de ambiente permanente (σ_{pe}^2) e variância residual (σ_e^2) para características de produção e morfológicas de oócitos. Observou-se que todas as características de contagem apresentaram maiores estimativas de σ_a^2 que suas respectivas correspondentes em porcentagem (após aplicação das transformações nos dados).

Tabela 2: Estimativas de variância genética aditiva (σ_a^2), variância de ambiente permanente (σ_{pe}^2) e variância residual (σ_e^2) para as características de produção e morfológica de oócitos em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	σ_a^2	σ_{pe}^2	σ_e^2
OV	0,0436	0,0143	0,0462
POV	0,0039	0,0006	0,0342
G1	0,0057	0,0026	0,0535
PG1	0,0012	0,0001	0,0244
G2	0,0105	0,0084	0,0724
PG2	0,0032	0,0001	0,0368
G3	0,0440	0,0159	0,0531
PG3	0,0027	0,0006	0,0384

OV: número de oócitos viáveis; POV: porcentagem de oócitos viáveis; G1, G2 e G3: número de oócitos grau I, II e III, respectivamente; PG1, PG2 e PG3: porcentagem de oócitos grau I, II e III, respectivamente.

As tabelas 3 e 4 apresentam as estimativas de variância genética aditiva (σ_a^2), de ambiente permanente (σ_{pe}^2) e residual (σ_e^2) para características de produção *in vitro* de embriões e prenhez (EV, PEV, PR e PPR).

Tabela 3: Estimativas de variância genética aditiva (σ^2_a), variância de ambiente permanente (σ^2_{pe}) e variância residual (σ^2_e) para as características de produção *in vitro* de embriões, em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	σ^2_a	σ^2_{pe}	σ^2_e
EV	0,0237	0,0226	0,0877
PEV	0,0071	0,0070	0,0487

EV: Número de embriões viáveis e PEV: Porcentagem de embriões viáveis

Tabela 4: Estimativas de variância genética aditiva (σ^2_a), variância de ambiente permanente (σ^2_{pe}) e variância residual para as características de prenhez, em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	σ^2_a	σ^2_{pe}	σ^2_e
PR	0,0074	0,0059	0,0638
PPR	0,0037	0,0009	0,2314

PR: número de prenhez e PPR: Porcentagem de prenhez.

Os valores de herdabilidade e repetibilidade estimados para as características de produção e morfológicas de oócitos variaram de $0,42 \pm 0,03$ (OV) à $0,05 \pm 0,01$ (PG1) e de $0,56 \pm 0,01$ (OV) à $0,05 \pm 0,01$ (PG1), respectivamente (Tabela 5). Observou-se que as características de contagem apresentaram os maiores valores de herdabilidade e repetibilidade em relação às características expressas em percentuais.

Tabela 5: Estimativas de herdabilidade e repetibilidade, com seus respectivos erros padrão, para as características de produção e morfológicas de oócitos em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	Herdabilidade	Repetibilidade
OV	$0,42 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,01$
POV	$0,10 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$
G1	$0,09 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$
PG1	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
G2	$0,11 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$
PG2	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
G3	$0,39 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,01$
PG3	$0,06 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$

OV: número de oócitos viáveis; POV: porcentagem de oócitos viáveis; G1, G2 e G3: número de oócitos grau I, II e III, respectivamente; PG1, PG2 e PG3: porcentagem de oócitos grau I, II e III, respectivamente.

Para as características de produção *in vitro* de embriões e prenhez (EV, PEV, PR e PPR) (Tabela 6 e 7), observou-se os seguintes valores estimados de herdabilidade e repetibilidade.

Tabela 6: Estimativas de herdabilidade e repetibilidade, com seus respectivos erros padrão, para as características de produção *in vitro* de embriões em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	Herdabilidade	Repetibilidade
EV	$0,18 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,01$
PEV	$0,11 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$

EV: Número de embriões viáveis e PEV: Porcentagem de embriões viáveis

Tabela 7: Estimativas de herdabilidade e repetibilidade, com seus respectivos erros padrão, para as características de prenhez em doadoras Gir Leiteiro.

Característica	Herdabilidade	Repetibilidade
PR	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,01
PPR	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

PR: número de prenhez e PPR: Porcentagem de prenhez.

As estimativas das correlações genéticas e fenotípicas entre as características avaliadas são apresentadas na Figura 1. Destacam-se valores de correlações genéticas altas entre OV e as características de contagem (G1, G2, G3, EV e PR), com valores de 0,88, 0,82, 0,98, 0,84 e 0,78, respectivamente.

Os valores das estimativas das correlações fenotípicas apresentaram-se de moderados a nulos. Correlações genotípicas e fenotípicas negativas também foram encontradas, indicando antagonismo entre algumas características, como por exemplo entre PG2 e PG3, com valor de -0,19 ± 0,08.

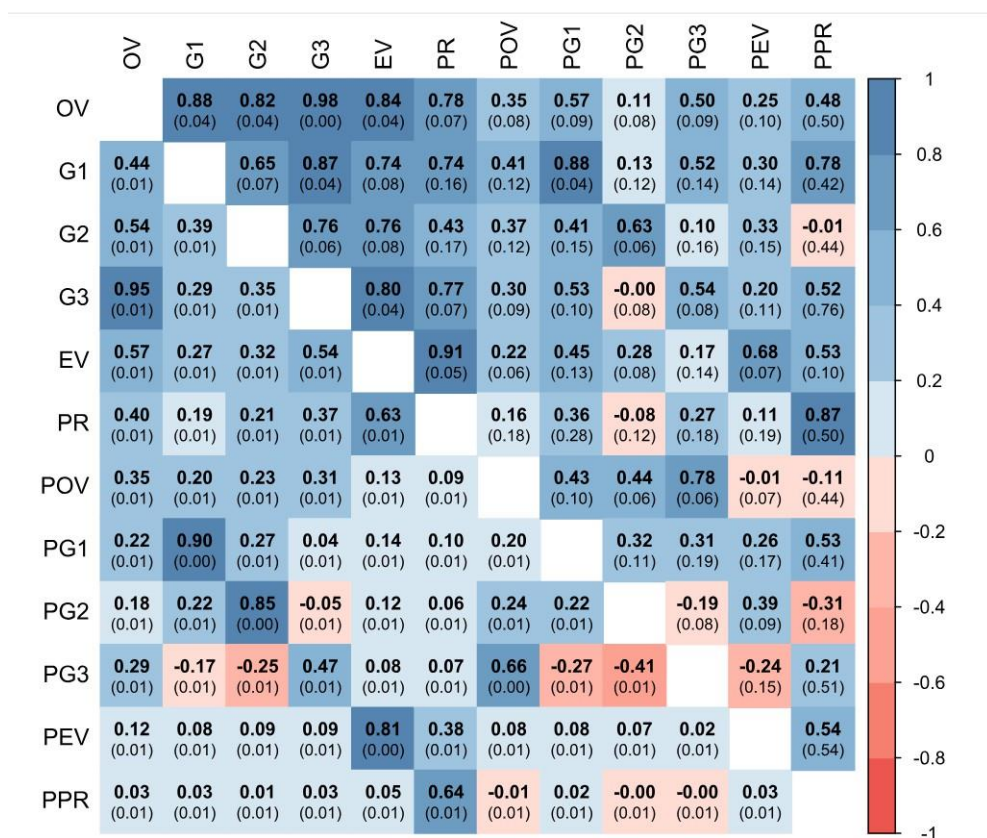


Figura 1. Correlações genéticas (acima da diagonal) e fenotípicas (abaixo da diagonal) entre as características de produção de oócitos, produção *in vitro* de embriões e prenhez em doadoras Gir Leiteiro. Os valores entre parênteses representam os respectivos erros-padrão das correlações. As cores indicam a magnitude e direção das correlações, sendo azul para correlações positivas e vermelho para negativas.

G1, G2 e G3: número de oócitos grau I, II e III, respectivamente; PG1, PG2 e PG3: porcentagem de oócitos grau I, II e III; OV e POV: número e à porcentagem de embriões viáveis; EV: número de embriões viáveis; PEV porcentagem de embriões viáveis; PR: número de prenhez; PPR: porcentagem de prenhez.

4.3.3 Correlação de *Spearman*

A Figura 2 representa as correlações de *Spearman* entre os valores genéticos dos 5% melhores machos (acima da diagonal) e as 20% melhores fêmeas (abaixo da diagonal) com base no EBV para as características de produção e morfológicas de oócitos, de produção *in vitro* de embriões viáveis e prenhez. A figura utiliza uma escala de cores para indicar a magnitude e a direção das correlações, em que tons de azul mais escuros representam correlações mais fortes e positivas, enquanto tons avermelhados indicam correlações negativas.

Dentre as correlações algumas das características que apresentaram as maiores correlações, para as melhores fêmeas, foram entre as características de contagem com sua respectiva proporção, por exemplo, G1 e PG1 (0,82), G2 e PG2 (0,71), além disso OV e G3 apresentaram uma alta correlação de 0,93. As demais características apresentaram correlações menores que 80%. Já para os touros, observou-se correlações ainda menores em comparação com as fêmeas, provavelmente devido à maior pressão de seleção. Sendo a maior correlação encontrada entre OV e G3 (0,93). Para as demais características os valores foram menores que 0,80, indicando haver reordenamento dos melhores animais de uma característica para a outra.

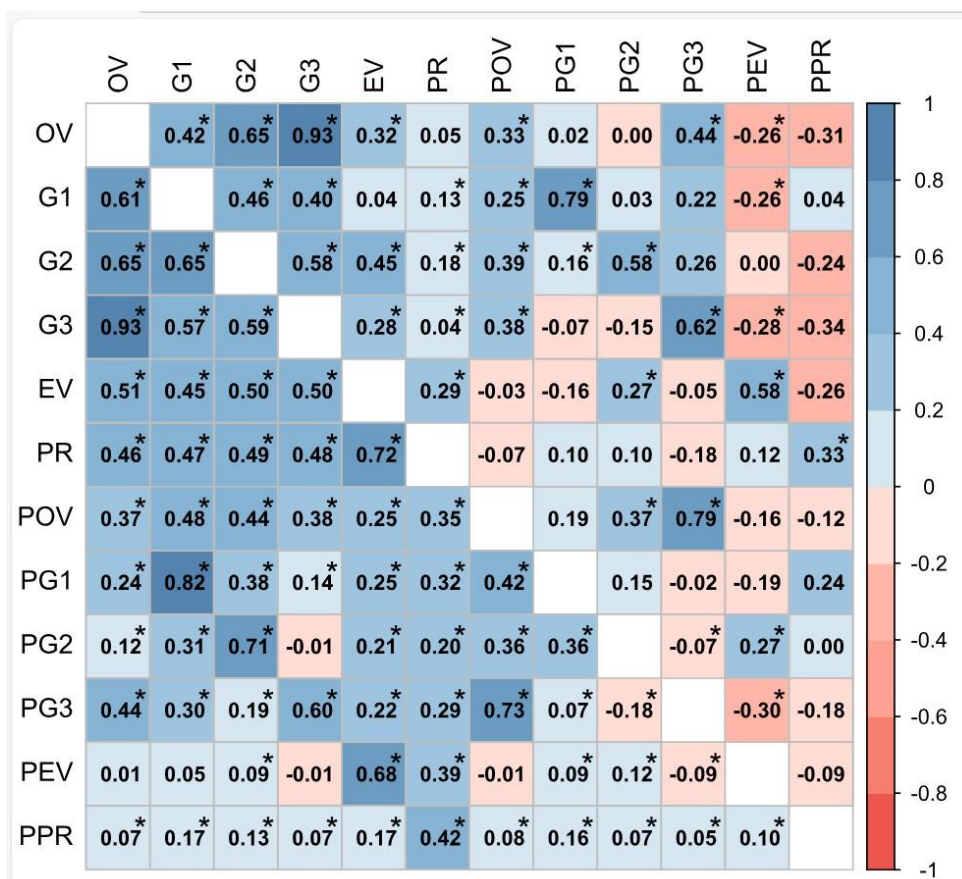


Figura 2. Coeficientes de correlação de *Spearman* (ranking) entre os EBV para as características de produção de oócitos, produção *in vitro* de embriões e prenhez entre os 5% Melhores Machos (acima da diagonal) e 20% Melhores Fêmeas (abaixo da diagonal).

G1, G2 e G3: número de oócitos grau I, II e III, respectivamente; PG1, PG2 e PG3: porcentagem de oócitos grau I, II e III; OV e POV: número e à porcentagem de embriões viáveis; EV: número de embriões viáveis; PEV porcentagem de embriões viáveis; PR: número de prenhez; PPR: porcentagem de prenhez; * representa os valores significativos (a nível de 5%).

4.3.4 Tendência genética

A tendência genética dos EBV das doadoras ao longo dos anos de nascimento das doadoras, para as características de produção e morfológica de oócitos é representada na Figura 3.

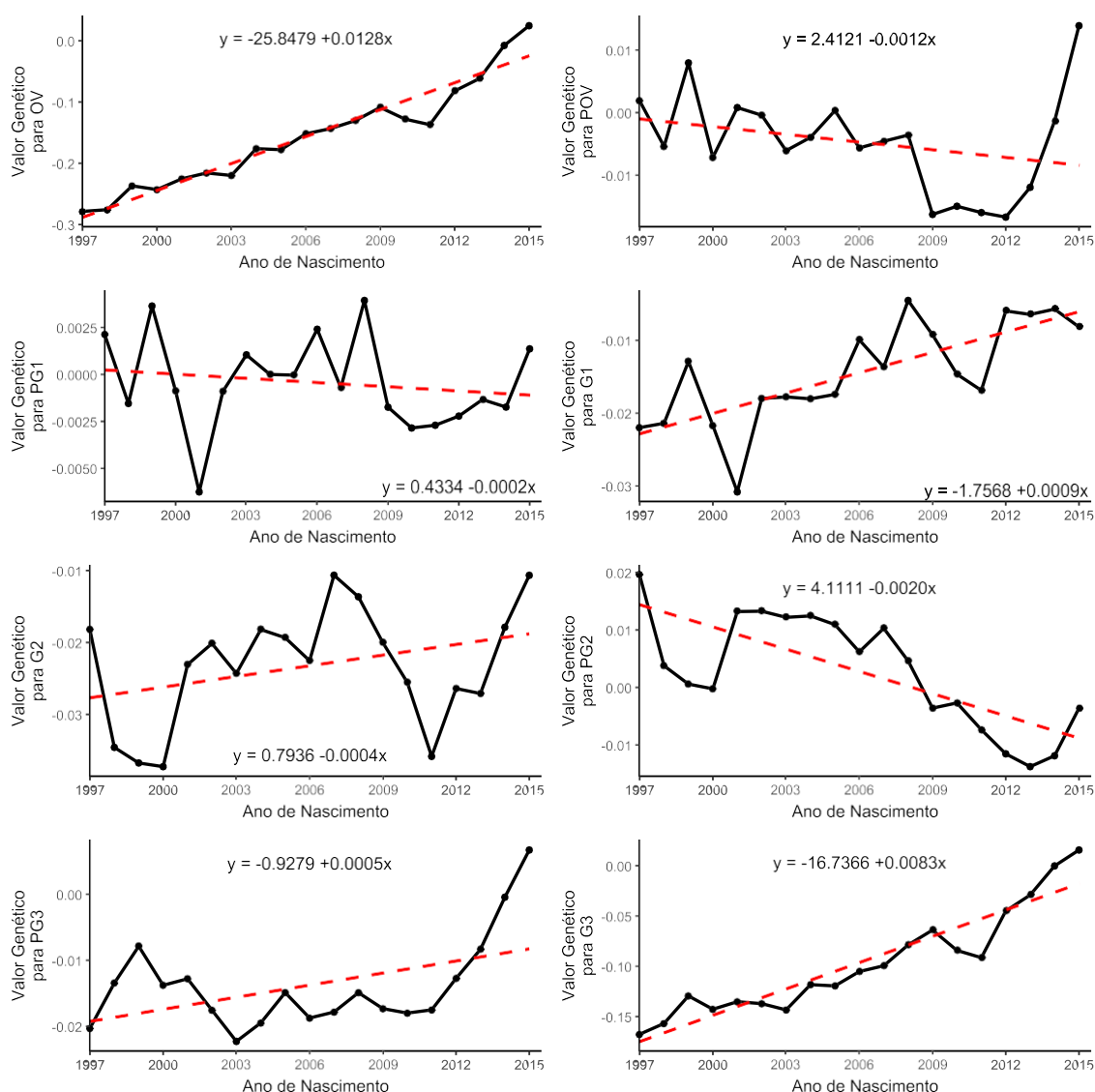


Figura 3: Tendência genética dos valores genéticos para características de produção e morfológica de oócitos, em doadoras Gir Leiteiro. Em que OV e POV correspondem ao número e à porcentagem de oócitos viáveis; G1, G2 e G3 representam o número de oócitos grau I, II e III, respectivamente, enquanto PG1, PG2 e PG3 indicam a porcentagem desses oócitos.

A tendência genética para as características de produção *in vitro* de embriões (EV e PEV) (Figura 4) e prenhez (PR e PPR) (Figura 5) são apresentadas nas figuras abaixo.

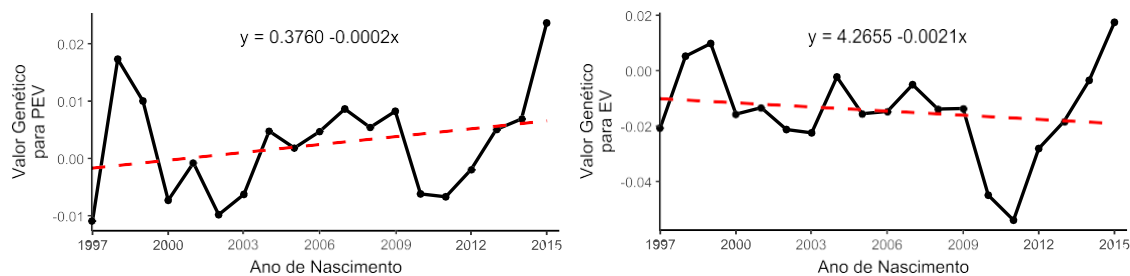


Figura 4: Tendência genética dos valores genéticos para características de produção *in vitro* de embriões, em doadoras Gir Leiteiro. Em que EV e PEV representam, respectivamente, o número e porcentagem de embriões viáveis.

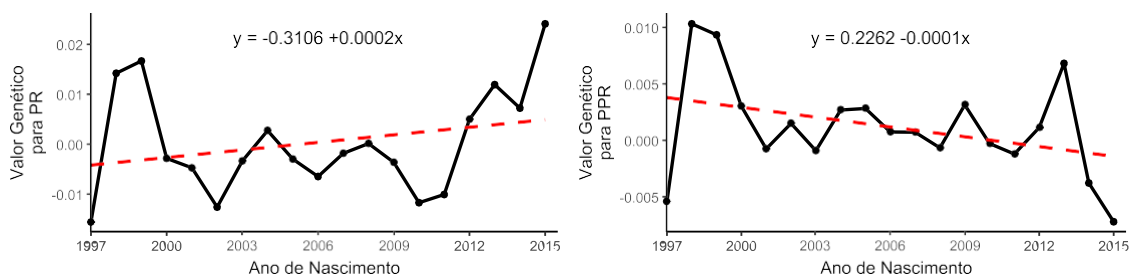


Figura 5: Tendência genética dos valores genéticos para características de prenhez, em doadoras Gir Leiteiro. Em que PR e PPR representam, respectivamente, o número e porcentagem de embriões viáveis.

4.4 Discussão

Nossos principais resultados indicaram a existência significativa de variância genética aditiva, o que confirma a viabilidade da aplicação de seleção genética para as características avaliadas. As estimativas de herdabilidade, de baixa a moderada magnitude, especialmente para as características de contagem, que apresentaram os maiores valores, reforçam esse potencial. Embora a repetibilidade também tenha sido estimada, é importante destacar que esse parâmetro não está diretamente relacionado ao ganho genético, mas sim à proporção da variação total que pode ser atribuída a diferenças permanentes entre os indivíduos. Nesse sentido, a repetibilidade é útil para definir o número ideal de medições necessárias por animal para aumentar a acurácia da seleção. Assim, para características com baixa repetibilidade, será necessário um maior número de observações por indivíduo para garantir uma avaliação mais precisa e, consequentemente, mais eficiente dos candidatos à seleção. Dessa forma, a repetibilidade contribui indiretamente para o ganho genético ao influenciar a acurácia das estimativas de mérito genético.

As estimativas de correlação genética revelaram associações importantes entre as características analisadas, em especial entre a taxa de prenhez (PPR) e a produção de embriões viáveis (EV), e entre o número de oócitos viáveis (OV) e o grau morfológico G1. Os achados sobre as estimativas de correlação genética indicam que o número de oócitos viáveis, por apresentar maior herdabilidade e ser facilmente obtida nos procedimentos da PIVE, pode ser um critério vantajoso para a seleção indireta da taxa de prenhez em programas de PIVE.

Ao analisar a correlação de *Spearman* entre os EBVs de grupos dos animais selecionados para as várias características, também identificamos uma correlação moderada (0,72) entre o número de embriões viáveis aleatório (EV) e o número de prenhez (PR) para as fêmeas, indicando que ao selecionar as melhores doadoras para número de embriões viáveis produzido não necessariamente estaríamos selecionando as melhores doadoras para número de prenhez. Enquanto que tanto entre os EBVs das fêmeas quanto dos machos, a correlação entre número médio de oócitos (OV) e número médio de oócitos grau III (G3) foi de 0,93, indicando que fazendo a seleção dos melhores animais para oócitos viáveis, estaríamos provavelmente selecionando os melhores machos e fêmeas para oócitos grau III (G3).

Observa-se também que, mesmo sem haver seleção genética para as características morfológicas e de produção de oócitos na raça Gir Leiteiro, o EBV médio dos animais sofreu sutil aumento ao longo dos anos.

Estatística descritiva

As raças zebuínas, quando comparadas às taurinas, apresentam maiores números de oócitos viáveis, mostrando desempenho superior desses animais em características relacionadas à PIVE (BATISTA et al., 2014; GIMENES et al., 2015; VIZONÁ et al., 2020). Assim como reportado neste estudo (OV = $16,98 \pm 13,01$) (Tabela 1) e por Pontes et. al. (2010, 2011), onde número de oócitos viáveis por sessão de aspiração em doadoras das raças Nelore, Gir Leiteiro e Holandesa foram, respectivamente, $23,4 \pm 0,7$, $12,1 \pm 3,9$ e $8,0 \pm 2,7$, observou-se que os animais da raça Holandesa apresentaram produção consideravelmente inferior aos animais da raça Gir e Nelore. Diante do exposto, a discussão dos resultados desse trabalho será focada em outros estudos com animais zebuínos reportados na literatura.

A maioria das características avaliadas apresentaram valores médios superiores à mediana (Tabela 1), o que indica a presença de animais com registros reprodutivos elevados para as características avaliadas, assim como os altos valores de desvio padrão sugerem grande variabilidade fenotípica entre as observações, quer seja por diferenças genéticas ou ambientais.

Para oócitos viáveis (OV= $16,98 \pm 13,01$) nossos resultados foram semelhantes a $16,24 \pm 13,01$ oócitos viáveis relatado por Feltes et. al. (2022) em doadoras da raça Gir, a $15,78 \pm$

12,91, por Machado et. al. (2024) em Gir, e a $15,6 \pm 12,7$, por Perez et. al. (2016) em doadoras Guzerá; e inferior a $24,7 \pm 3,5$ relatado por Gimenes et. al. (2015) em doadoras Nelore. Ressalta-se que a semelhança observada com os resultados de Feltes et al. (2022), era esperada por se tratarem da mesma população, porém em nosso estudo a base foi atualizada, apresentando maior quantidade de observações.

Para porcentagem de oócitos viáveis (POV), observamos valor médio de $73,90 \pm 15,78$, maior que o de $20,6 \pm 3,2$ apresentado por Gimenes et al. (2015) na raça Nelore, indicando que apesar de possuir menor número de oócitos viáveis, quando comparadas a doadoras Nelore, as fêmeas Gir, em nosso estudo apresentaram maior taxa de oócitos viáveis em relação ao total de oócitos coletados, demonstrando que doadoras Gir, apresentam maior viabilidade de oócitos que as fêmeas Nelore, e que dentro do mesmo grupamento genético (*Bos indicus*) também há diferenças importantes entre raças.

Em relação a característica G1 ($0,85 \pm 1,50$) e PG1 ($3,76 \pm 6,86$), nossos resultados foram inferiores aos relatados por Merton et. al. (2009) em doadoras da raça Holandesa e Perez et al. (2016) em doadoras da raça Guzerá, que observaram valores de 26,6% (PG1) e de 3,32 (G1) e 22,57% (PG1), respectivamente. Do total de oócitos coletados, 61,18% foram de oócitos grau 3, e apenas 3,76% (G1) e 8,96% (G2) referentes aos oócitos de qualidade superior. Com esses resultados, podemos inferir que essas diferenças em termos qualitativos podem ser devido à diversos fatores genéticos, biológicos e ambientais.

Em relação ao número de oócitos viáveis apenas 26,7% dos oócitos coletados geraram embriões viáveis ($EV = 4,53 \pm 4,57$), demonstrando que melhorias no potencial genéticos e nas condições ambientais que os animais são submetidos são fundamentais para melhorar a produção de embriões viáveis produzidos *in vitro*. Esse valor foi semelhante ao reportado por Feltes et al. (2022) e superior ao de Machado et al. (2014), com valores de $4,55 \pm 4,53$ e $3,81 \pm 4,28$, respectivamente, sendo ambos em animais da raça Gir.

Ao considerar o número de embriões transferidos, 40,74% deles resultaram em prenhez (PPR), sendo superiores aos 37,27% relatados por Pontes et al. (2011) em doadoras Nelore, provavelmente devido a diferenças entre as raças ou ao ambiente, visto que os trabalhos ocorreram em condições climáticas distintas. Esses resultados demonstram a existência de grande potencial de melhoria que ainda pode ser alcançada, através de melhoria genética e melhorias ambientais, uma vez que é uma característica influenciada por diversos fatores ambientais externos, como estresse térmico da receptora (FANG et al., 2014) e a paridade da receptora (NISHISOUZU et al., 2017).

Parâmetros genéticos

Para as características morfológicas e de produção de oócitos (OV, G1, G2, G3, POV, PG1, PG2 e PG3) observou-se maiores valores da variância genética aditiva nas características de contagem em comparação às de porcentagem (Tabela 2), diferenças que são biologicamente esperadas, já que são características de escalas (contagem e porcentagem) que apresentam magnitudes diferentes mesmo após as transformações de dados aplicadas. De maneira geral, os componentes de variância genética aditiva para essas características diferiram de estudos anteriores envolvendo raças zebuínas (PEREZ et al., 2016; VIZONÁ et al., 2020; MACHADO et al., 2024), provavelmente devido a diferenças na estrutura populacional, efeitos fixos e aleatórios incluídos nos modelos e diferenças no manejo dos animais, o que também era esperado e explica as altas variâncias residuais observadas entre os estudos.

As herdabilidades observadas no presente estudo indicam que maior resposta à seleção é esperada para OV ($0,42 \pm 0,03$) e G3 ($0,39 \pm 0,03$) (Tabela 5). As demais características morfológicas de oócitos, apresentaram baixa herdabilidade, variando de $0,05 \pm 0,01$ (PG1) a $0,11 \pm 0,02$ (G2), indicando forte influência ambiental, especialmente para características expressas em porcentagem. As estimativas de repetibilidades seguiram o mesmo padrão das

estimativas de herdabilidade, com OV ($0,56 \pm 0,01$) e G3 ($0,53 \pm 0,01$) apresentando os maiores valores. Esses resultados são semelhantes aos de Perez et al. (2016) e inferiores aos de Vizoná et al. (2020) para OV, verificados nas raças Guzerá e Gir Leiteiro, respectivamente.

Para as características de produção de embriões (EV e PEV), também foram observadas maiores variâncias genéticas aditivas para características de contagem do que para aquelas expressas em percentagem (Tabela 3). O valor de 0,18 para EV é próximo aos encontrados por Machado et al. (2024) em animais da raça Gir, Merton et al. (2009) em animais da raça holandesa e que utilizou um modelo touro e Perez et al. (2016) em animais Guzerá, mostrando pouca variação de resultados em relação à diferentes raças.

A repetibilidade foi maior para a característica de contagem EV ($0,34 \pm 0,01$) do que para porcentagem PEV ($0,22 \pm 0,01$) (Tabela 6). Nossos resultados de EV estão de acordo com a literatura, embora sejam inferiores aos relatados por Vizoná et al. (2020), que usou o touro como efeito fixo no modelo. Os baixos valores de herdabilidade e repetibilidade reforçam a influência significativa de fatores não genéticos, como tipo de sêmen (MAGATA et al., 2021), nutrição (SALES et al., 2015) e estresse térmico (FELTES et al., 2024), no desempenho da produção *in vitro* de embriões, entretanto, os baixos valores não inviabilizam a realização de melhoramento genético por seleção, apenas o torna mais demorado. Nesse caso, é importante verificar as correlações genéticas dessas características com outras para verificar a possibilidade da realização de seleção indireta

Para as características relacionadas à taxa de prenhez (PR e PPR), observaram-se baixas variâncias genéticas aditivas (Tabelas 6 e 7). Isso resultou em baixas herdabilidades e repetibilidades, principalmente para a característica taxa de prenhez. Esses resultados indicam que fatores não genéticos, como o procedimento de transferência, idade e nutrição da doadora e clima, podem ter grande influência sobre a taxa de prenhez, reduzindo o potencial de resposta à seleção direta.

Para PPR, o valor estimado de herdabilidade foi baixo e similar ao valor de 0,02 relatado por Pinheiro et al. (2024) em animais Nelore. Porém, diferenças metodológicas, como de raça, modelo e divergências no cálculo da taxa de prenhez limitam a comparação direta entre nosso estudo e o de Pinheiro et al. (2004).

As estimativas de repetibilidade para as características de prenhez foram baixas, variando de $0,02 \pm 0,01$ a $0,17 \pm 0,01$ (Tabela 7). Esses resultados indicam que há uma alta variabilidade entre as coletas, o que compromete a previsibilidade do desempenho reprodutivo futuro com base em poucos registros. Repetibilidades baixas limitam a utilidade prática dessas informações para decisões de manejo, como o descarte ou a seleção de doadoras.

Foram observadas correlações genéticas elevadas entre o número de oócitos viáveis (OV) e os graus de qualidade G1 ($0,88 \pm 0,04$), G2 ($0,82 \pm 0,04$) e G3 ($0,98 \pm 0,00$), indicando que a seleção para maior produção de OV, tende a favorecer a obtenção de oócitos dos três graus de qualidade, especialmente grau 3. No entanto, as correlações fenotípicas entre essas características apresentaram correlações fenotípicas moderadas a baixas ($0,44 \pm 0,01$, entre OV com G1, $0,18 \pm 0,01$, entre OV com G2 e $0,29 \pm 0,01$, entre OV com G3), indicando que os mesmos fatores genéticos e ambientais exercem moderada influência sobre a expressão dessas características.

O número de embriões viáveis (EV) apresentou fortes correlações genéticas com G2 ($0,76 \pm 0,08$) e G3 ($0,80 \pm 0,04$), bem como com OV ($0,84 \pm 0,04$), reforçando que a seleção para animais de maior mérito genético para a qualidade oocitária também promoveram ganhos genéticos na competência oocitária. Do ponto de vista fenotípico, essas associações também foram positivas, embora modestas ($0,32 \pm 0,01$ com G2 e $0,54 \pm 0,01$ com G3), novamente indicando que a competência oocitária é altamente dependente da qualidade do oócito, mas também majoritariamente sujeita a variações não genéticas, como influências ambientais no momento da produção *in vitro*. Esses achados sustentam estratégias que priorizem tanto a

seleção de doadoras com alto mérito genético quanto o controle rigoroso das condições ambientais de aspiração e cultivo.

As correlações genéticas entre o número de embriões viáveis (EV) e as características de prenhez foram elevadas, especialmente com prenhez registrada (PR = $0,91 \pm 0,05$) e, em menor grau, com prenhez por transferência de embriões (PPR = $0,53 \pm 0,10$). Esses resultados reforçam a importância de considerar características associadas à competência embrionária, como o número de embriões viáveis, nos critérios de seleção de doadoras. A inclusão desse tipo de variável em índices reprodutivos pode contribuir para ganhos genéticos indiretos em características de interesse, como a taxa de prenhez.

O produto final na produção *in vitro* de embriões é o estabelecimento da prenhez na receptora, logo deseja-se maiores taxas de prenhez com essa biotecnologia. O número de prenhez (PR) apresentou correlação genética positiva alta com a característica embriões viáveis (EV) com estimativa de $0,91 \pm 0,05$ e de $0,84 \pm 0,04$, entre o número de oócitos viáveis (OV) e número de embriões viáveis (EV). Logo, o aumento do número de prenhez poderia ser alcançado de forma indireta, ao selecionar-se animais para número de oócitos viáveis (OV), que é uma característica, que além de possuir correlação genética alta e favorável com EV, também possui alto valor de herdabilidade ($0,42 \pm 0,03$), indicando menor influência de fatores não genéticos (ambientais). Neste sentido o elevado valor para a estimativa de repetibilidade ($0,56 \pm 0,01$) é um indicativo seguro das produções futuras da doadora para essa característica com base nas primeiras coletas (OPU).

Além disso, a OV é uma característica observada bem no início do processo de produção *in vitro* enquanto o número de prenhez seria o resultado final, com isso, selecionando para essa OV provavelmente os custos seriam reduzidos.

Já a correlação genética entre OV e PPR foi moderada ($0,48 \pm 0,50$) e a fenotípica praticamente nula ($0,03 \pm 0,01$), revelando que a quantidade de oócitos viáveis, por si só, tem pouca relação genética com o sucesso final da prenhez por embriões transferidos. Portanto, estratégias de melhoramento devem considerar não apenas o aumento da produção de oócitos, mas também a competência oocitária e a viabilidade gestacional.

Em conjunto, esses resultados indicam que o sucesso reprodutivo em programas de PIVE depende de um equilíbrio entre quantidade e qualidade dos oócitos, além de um controle rigoroso das condições ambientais, principalmente em relação aos procedimentos envolvidos na produção *in vitro* de embriões. A inclusão de informações genéticas no processo de seleção de doadoras pode potencializar os ganhos reprodutivos, especialmente quando integradas a características pós-transferência como a taxa de prenhez.

Correlação de *Spearman*

A classificação dos animais por seus méritos genéticos deve ser utilizada como guia nas decisões de seleção animal, uma vez que a seleção dos melhores animais para uma dada característica apresenta impacto na reposta esperada em outras características, logo é imprescindível considerar no processo de seleção a associação entre os valores genéticos estimados (EBV) entre diferentes características.

A correlação de *Spearman* entre as características OV com G3 (0,93) foi alta. Sugerindo que a seleção dos animais com maior mérito genético para oócitos viáveis estaríamos selecionando os mesmos animais com maiores valores genéticos para oócitos de grau 3. As demais correlações entre as outras características apresentaram valores moderados a baixos. Indicando um reordenamento dos animais com os maiores valores genéticos de uma característica para outra, nesse sentido, deve-se fazer seleção individualizada para cada característica ou então por meio de índice de seleção.

Por outro lado, características expressas em porcentagem (POV, PEV e PPR) mostraram correlações mais baixas tanto entre si quanto com características de contagem, reforçando que

a seleção direta sobre essas características pode ser mais eficiente para promover ganhos. Esses resultados indicam que a utilização das características em seu formato natural (contagem) na definição dos critérios de seleção seriam uma melhor opção, visto que refletem maior variabilidade genética aditiva (VIZONÁ et al., 2020; FELTES et al., 2022).

Diante da complexidade dos fatores que afetam a competência oocitária e os resultados da PIVE, uma estratégia promissora seria o uso de índices de seleção que integrem múltiplas características reprodutivas, como número de oócitos viáveis, taxa de clivagem e taxa de blastocisto, com ênfase em características de fácil mensuração, avaliadas precocemente e de menor custo. Sempre que possível, tais índices devem incluir também características produtivas de interesse econômico, como idade a primeira cria que possui correlação genética positiva com OV (VIZONÁ et al., 2020), visando à obtenção de um equilíbrio entre desempenho produtivo e reprodutivo. Alternativamente, podem ser desenvolvidos índices específicos para características da produção de oócitos, embriões e taxa de prenhez, otimizando a seleção para maior eficiência reprodutiva sem comprometer outros aspectos do sistema de produção.

Tendência Genética

A análise da tendência genética revelou que o progresso genético para as características foi bem próximo de zero, havendo um aumento sutil para características morfológicas e de produção de oócitos de contagem, provavelmente por seleção indireta para outras características produtivas como idade a primeira cria, que de acordo com Vizoná et al. (2020) apresenta correlação genética positiva com essa característica. Apesar do avanço geral da genética da raça Gir Leiteiro, influenciado pela melhoria de características correlacionadas com a fertilidade, resistência ao estresse térmico e adaptabilidade, produção e qualidade do leite, critérios de seleção historicamente considerados nos programas de melhoramento da raça (SILVA et al., 2018; CANAZA-CAYO et al., 2019), não houve reflexo significativo no progresso genético das características avaliadas no nosso estudo, reforçando a importância de incluí-las nos programas de melhoramento genético por seleção.

Em contraste, características expressas em porcentagem apresentaram tendências genéticas menores ou negativas, refletindo tanto a maior influência ambiental sobre essas medidas quanto a menor variabilidade genética disponível para exploração. Esses resultados indicam que programas de melhoramento genético focados em características absolutas de produção, como OV e EV, podem gerar ganhos significativos e sustentáveis no desempenho reprodutivo *in vitro*. Assim, a incorporação de características associadas à produção de oócitos e embriões em avaliações genéticas formais via uso de índices pode contribuir para a melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos Gir Leiteiro.

4.5 Conclusões

Nosso estudo evidenciou variabilidade genética aditiva suficiente para a realização de seleção genética para características morfológicas, de produção de oócitos, produção in vitro de embriões e taxa de prenhez em doadoras da raça Gir Leiteiro. As estimativas de herdabilidade e repetibilidade indicaram maior potencial de resposta à seleção para o número de oócitos viáveis (OV) e número de oócitos grau III. Entre essas, destaca-se o número de oócitos viáveis como característica recomendada para a seleção indireta, por apresentar maior herdabilidade e correlações genéticas favoráveis e positivas com o número de embriões viáveis e com a taxa de prenhez. Isso reforça seu potencial como um indicador precoce e eficiente de desempenho reprodutivo. A incorporação dessas características nos programas de avaliação genética, associada a estratégias de manejo reprodutivo adequadas, pode contribuir para o aumento da eficiência reprodutiva e para ganhos genéticos e econômicos no uso da produção in vitro de embriões em larga escala.

4.6 Referências Bibliográficas

- ANDRADE, G. A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 66–69, 2012.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, supl. 4, p. 134–141, 2012.
- BATISTA, E. et al. Plasma Antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 448–452, 2014.
- CANAZA-CAYO, A. W. et al. Genetic trend estimates for milk yield production and fertility traits of the Girolando cattle in Brazil. **Livestock Science**, v. 190, p. 113–122, 2019.
- FANG, Y. et al. Developmental competence *in vitro* and *in vivo* of bovine IVF blastocyst after 15 years of vitrification. **CryoLetters**, v. 35, n. 3, p. 232–238, 2014.
- FELTES, G. L. et al. Genetic evaluation of oocyte and embryo production in dairy Gir cattle using repeatability and random regression models. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, p. 1–19, 2022.
- FELTES, G. L. et al. Impact of heat stress on genetic evaluation of oocyte and embryo production in Gir dairy cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 56, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03850-7>.
- GIMENES, L. U. et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pick-up does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, p. 385–393, 2015.
- GUIMARÃES, P. H. S.; MADALENA, F. E.; CEZAR, I. M. Comparative economics of Holstein/Gir F1 dairy female production and conventional beef cattle suckler herds – a simulation study. **Agricultural Systems**, v. 88, p. 111–124, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa – BDMEP**. 2025. Disponível em: <https://bdmep.inmet.gov.br/>.
- JATON, C. et al. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3612–3623, 2016.
- LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and cultivation of bovine follicular oocytes. 1992. Doctoral Thesis – National University of Ireland.
- MACHADO, A. F. et al. Genetic parameters for oocytes and embryo production and their association with linear type traits in dairy Gyr cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 11, p. 9666–9675, 2024.
- MACHADO, S. A. et al. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 573–583, 2006.
- MAGATA, F. et al. Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. **Theriogenology**, v. 161, p. 243–251, 2021.
- MELLO, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 58–64, 2016.
- MERTON, J. S. et al. Effect of oocyte quality on development of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 71, p. 1120–1131, 2009.

- MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651–674, 2003.
- MISZTAL, I. et al. BLUPF90 and related programs (BGF90). **In**: Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France, 2002.
- NISHISOUZU, T. et al. Factors affecting pregnancy rates in the transfer of *in vitro*-produced Japanese Black cattle embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 157–158, 2017.
- PARKER GADDIS, K. L. et al. Evaluation of genetic components in traits related to superovulation, *in vitro* fertilization, and embryo transfer in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2877–2891, 2017.
- PEREZ, B. C. et al. Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1–13, 2016.
- PINHEIRO, A. K. et al. Parâmetros genéticos da produção *in vitro* de embriões das raças Nelore e Senepol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 25, e-77620P, 2024.
- PONTES, J. H. et al. 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.
- PONTES, J. H. et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640–1646, 2011.
- SALES, J. N. S. et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3086–3099, 2015.
- SARTORI, R. et al. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 67, suppl., p. 357–375, 2010.
- SILVA, M. V. G. B. et al. **Girolando breed genetic improvement program sire summary**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2018.
- VIANA, J. H. M. et al. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12–18, 2012.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 476–481, 2017.
- VIZONÁ, R. G. et al. Genetic analysis of *in vitro* embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, p. 149–161, 2020.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A presente dissertação teve como objetivo investigar os fatores ambientais e genéticos que influenciam a produção *in vitro* de embriões em doadoras da raça Gir leiteiro, por meio da análise de dois conjuntos de dados obtidos em programas comerciais de reprodução assistida.

No Capítulo I, observou-se que a estação do ano, a idade e a categoria fisiológica das doadoras têm impacto significativo sobre o número e a viabilidade dos oócitos coletados, bem como sobre as taxas de clivagem, de formação de blastocistos e de prenhez. A primavera e o inverno apresentaram melhores taxas de prenhez, enquanto o verão foi associado a piores resultados em relação à taxa de blastocisto, indicando que o estresse térmico pode comprometer a eficiência da PIVE mesmo em raças zebuínas. Além disso, vacas adultas apresentaram desempenho reprodutivo superior ao de novilhas, reforçando a importância do histórico reprodutivo na escolha das doadoras.

No Capítulo II, foram estimados parâmetros genéticos para características relacionadas à PIVE, como número e porcentagem de oócitos viáveis, grau morfológico dos oócitos, produção embrionária e taxa de prenhez. Os resultados indicaram herdabilidades de baixa a moderada magnitude, sugerindo que há variabilidade genética suficiente para promover ganhos por meio da seleção. Isso demonstra o potencial de incluir características da PIVE como critérios em programas de melhoramento genético da raça Gir leiteiro.

Portanto, os resultados apresentados nesta dissertação evidenciam a importância de uma abordagem integrada, considerando tanto os fatores ambientais quanto os genéticos, para otimizar os resultados da produção *in vitro* de embriões em bovinos da raça Gir leiteiro. Tais achados contribuem para o aprimoramento das estratégias de manejo e seleção, com vistas a aumentar a eficiência reprodutiva, a produtividade e a sustentabilidade dos sistemas de produção leiteira no Brasil.