

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GUSTAVO PEREIRA CADIMA

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DA RAÇA SOBRE A PRODUÇÃO DE
OVÓCITOS, BLASTOCISTOS E TAXA DE PRENHEZ EM FÊMEAS BOVINAS
LEITEIRAS**

UBERLÂNDIA

2020

GUSTAVO PEREIRA CADIMA

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DA RAÇA SOBRE A PRODUÇÃO DE
OVÓCITOS, BLASTOCISTOS E TAXA DE PREENHEZ EM FÊMEAS BOVINAS
LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos

UBERLÂNDIA

2022

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DA RAÇA SOBRE A PRODUÇÃO DE
OVÓCITOS, BLASTOCISTOS E TAXA DE PREENHEZ EM FÊMEAS BOVINAS
LEITEIRAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 21 de dezembro de 2022.

Prof^a. Dr^a Ricarda Maria dos Santos

Prof. Dr^a Renata Lançoni

Prof^a. Dr^a. Leticia Zoccolaro Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C124e 2022 Cadima, Gustavo Pereira, 1996-
Efeito da sazonalidade e da raça sobre a produção de ovócitos, blastocistos e taxa de prenhez em fêmeas bovinas leiteiras [recurso eletrônico] / Gustavo Pereira Cadima. - 2022.

Orientadora: Ricarda Maria dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8095>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Santos, Ricarda Maria dos, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 14/2022				
Data:	21 DE DEZEMBRO DE 2022	Hora de início:	16:00	Hora de encerramento:	18:20
Matrícula do Discente:	12012MEV006				
Nome do Discente:	GUSTAVO PEREIRA CADIMA				
Título do Trabalho:	EFEITO DA SAZONALIDADE E DA RAÇA SOBRE A PRODUÇÃO OVÓCITOS, BLASTOCISTOS E A TAXA DE PREENHEZ EM FÊMEAS BOVINAS LEITERIAS				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DOS REBANHOS BOVINOS				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Renata Lançoni - FAMEV/UFU; Letícia Zoccolaro Oliveira - UFMG; Ricarda Maria dos Santos - FAMEV/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ricarda Maria dos Santos, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior, em 21/12/2022, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Leticia Zoccolaro Oliveira, Usuário Externo, em 21/12/2022, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Renata Lançoni, Professor(a) do Magistério Superior, em 22/12/2022, às 08:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4140282 e o código CRC E40156EE.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUSTAVO PEREIRA CADIMA: Nascido em Uberlândia - Minas Gerais, em 10 de abril de 1996, filho de Aguinaldo Pereira Cadima e Elizabeth Vieira Cadima. Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus por me oferecer tantas oportunidades e a saúde que preciso para enfrentar os desafios. Em segundo lugar gostaria de agradecer minha família, que sempre foi o alicerce para que eu pudesse sonhar e realizar meus sonhos. Queria agradecer minha professora e orientadora Ricarda Maria dos Santos por tanta paciência e dedicação no encaminhamento do trabalho e por ser, desde de a minha graduação, a fonte de inspiração para seguir no estudo e me apaixonar pela pesquisa e pela docência. Queria pôr fim agradecer meus colegas da Vale do Embrião que forneceram todo o suporte para que eu pudesse desenvolver meu trabalho e entregar os resultados, além da oportunidade de fazer parte dessa equipe que me orgulho de compor!!!

RESUMO

A produção in vitro de embriões (PIV) é uma técnica reprodutiva que visa acelerar o ganho genético de rebanhos pela multiplicação de machos e fêmeas. No entanto, o sucesso desta técnica depende de vários fatores. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da raça dos animais (Gir ou Girolando) e do período do ano (período seco = outono/inverno ou período chuvoso = primavera/verão) no momento da aspiração folicular (OPU) sobre parâmetros de produtividade como: produção de ovócitos, produção de blastocistos e taxa de prenhez das receptoras. Foi analisado o banco de dados de 1198 OPU, 27135 oócitos e 4483 TEs do laboratório comercial de produção de embriões, localizado no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. O número de oócitos viáveis e embriões produzidos foi avaliado por ANOVA e a taxa de prenhez das receptoras foi avaliada por regressão logística, ambos no programa MINITAB, incluindo no modelo a raça da doadora e estação do ano na OPU, bem como as interações. Observou-se efeito da interação entre raça doadora e período do ano na OPU ($P < 0,01$) sobre o número de oócitos coletados e embriões produzidos. Durante a estação chuvosa a produção de oócitos e embriões não foi diferente para Gir ($24,10 \pm 0,971$; $7,18 \pm 0,406$) e Girolando ($24,54 \pm 0,859$; $7,50 \pm 0,462$), porém, na estação seca, as doadoras Girolando ($23,58 \pm 0,789$; $8,85 \pm 0,425$) tiveram maior produção de ovócitos e embriões em relação ao Gir ($19,43 \pm 0,792$; $5,75 \pm 0,283$). Não houve interação entre a raça doadora e o período do ano na OPU na prenhez/TE. No entanto, o período do ano da transferência dos embriões teve efeito em relação a prenhez/TE ($49,18$ período chuvoso x $44,13$ período seco; $P = 0,026$). Já a raça da doadora não afetou a prenhez/TE. Em conclusão, a doadora Gir produz menor número de oócitos viáveis e embriões por aspiração no período seco, e os embriões Gir resultam em maior prenhez/TE em qualquer período do ano.

Palavras chave: PIVE; Sazonalidade; Eficiência Reprodutiva.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a reproductive technique that aims to accelerate the genetic gain of herds by multiplying males and females. However, the success of this technique depends on several factors. The aim of this study was to evaluate the effects of animal breed (Gir or Girolando) and time of year (dry period = autumn/winter or rainy period = spring/summer) at the time of follicular aspiration (OPU) on productivity parameters such as: oocyte production, blastocyst production and pregnancy rate of recipients. The database of 1198 OPU, 27135 oocytes and 4483 TEs from the commercial embryo production laboratory, located in Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, was analyzed. The number of viable oocytes and embryos produced was evaluated by ANOVA and the pregnancy rate of the recipients was evaluated by logistic regression, both in the MINITAB program, including in the model the donor's race and season of the year in the OPU, as well as the interactions. There was an effect of the interaction between donor race and time of year in OPU ($P < 0.01$) on the number of oocytes collected and embryos produced. During the rainy season the production of oocytes and embryos was not different for Gir (24.10 ± 0.971 ; 7.18 ± 0.406) and Girolando (24.54 ± 0.859 ; 7.50 ± 0.462), however, in the dry season, the Girolando donors (23.58 ± 0.789 ; 8.85 ± 0.425) had higher production of oocytes and embryos compared to Gir (19.43 ± 0.792 ; 5.75 ± 0.283). There was no interaction between donor breed and period of the year in the OPU in the pregnancy/ET. However, the period of the year of the transference of the embryos had effect in relation to the pregnancy/ET (49.18 rainy period x 44.13 dry period; $P = 0.026$). donor did not affect pregnancy/ET. In conclusion, donor Girolando produces more viable oocytes and embryos per aspiration in the dry period, and Gir embryos result in higher pregnancy/ET in any period of the year.

Keywords: IVP; Seasonality; Reproductive Efficiency.

1 INTRODUÇÃO

Visando a melhor aproveitamento da genética de fêmeas bovinas, alguns métodos e técnicas reprodutivas foram desenvolvidos, como é o caso da inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e os métodos de produção de embriões *in vivo* e *in vitro* de embriões. O processo de produção *in vitro*, no entanto, potencializa ainda mais o uso e difusão da genética da fêmea, pois possibilita o aproveitamento de ovócitos que naturalmente seriam perdidos (Caldas-Bussiere et al., 2021). Segundo Roth (2017) uma bezerra ao nascer possui cerca de 150 mil ovócitos e possui a capacidade de converter apenas 0,01% desse material genético em descendentes. Portanto, o potencial de disseminação de genética superior de fêmeas pode ser incrementado com o uso dessa biotécnicas.

Com o desenvolvimento de formas não invasivas da coleta de ovócitos, como é o caso da aspiração folicular guiada por ultrassom, conhecida como ovum pick up (OPU) (Pieterse et al., 1988), foi possível potencializar o uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE), que consiste na submissão dos ovócitos às etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário em um ambiente controlado, garantindo a conversão de ovócitos imaturos em embriões aptos a serem transferidos para receptoras (Viana et al., 2010).

Para o sucesso da técnica, portanto, se faz necessário mimetizar o ambiente materno, tanto em condições ambientais (temperatura e atmosfera), quanto às condições hormonais que os ovócitos e embriões são submetidos, o que é garantido com a utilização de meios específicos para cada etapa do processo (Hansen et al., 2020).

Como é um processo complexo e que envolve várias etapas, a PIVE está sujeita à alguns problemas produtivos, como é caso da questão racial e da sazonalidade da produção (Mello et al., 2016), além de diversos fatores intrínsecos da técnica (Hansen et al., 2020) que podem prejudicar os resultados. Baseado nisso a hipótese é a de que animais da raça Gir durante o período chuvoso teriam maior produção de ovócitos e maior taxa de produção de blastocistos, e os embriões transferidos resultariam em mais prenhez, por ser uma raça zebuína, considerada mais resistente.

Portanto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito das variáveis raça da doadora (Gir vs. Girolando) e período do ano no momento da aspiração folicular (período

seco vs. período chuvoso), sobre a produção de ovócitos, taxa de produção de blastocistos e na prenhez por transferência de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico do uso da PIVE

A utilização da técnica de transferência de embriões foi primeiramente reportada em coelhos ainda no século XIX e em bovinos em 1951 (Betteridge et al., 1981). Já o processo de produção *in vitro* de embriões foi realizado primeiramente em humanos (Steptoe et al., 1978) e posteriormente em bovinos (Brackett et al., 1982). Já o nascimento de um animal oriundo da PIVE foi reportado primeiramente por Goto et al. (1988).

Ainda que a tecnologia de produção *in vitro* já estivesse desenvolvida, com os primeiros relatos de sucesso em humanos e bovinos, durante os anos 70 e 80, a técnica ficou restrita a aplicações experimentais sem escalar para aplicação comercial vista nos dias de hoje (Hansen et al., 2020). Já nas publicações mais recente da International Embryo Transfer Society (IETS), o cenário é oposto, ve-se a ampliação expressiva do uso da técnica em todo mundo, com uma produção mundial que ultrapassou a marca de 1,5 milhões de embriões bovinos (IETS 2020).

Os dados também expostos pela IETS, mostram como ocorreu a inversão do uso da técnica *in vitro* em detrimento da produção *in vivo*. Em 1999, por exemplo, a IETS registrou a transferência de 547.664 embriões, dos quais 95% foram produzidos *in vivo* por superovulação (Thibier et al., 1999), mostrando que o método de produção *in vivo* dominava o cenário de produção comercial (Hansen et al., 2020).

Já no início do século XXI, o cenário passou a mudar com o aumento da adoção do método *in vitro* e com o crescimento constante a partir do ano de 2012 com taxa média de 15,8% do uso da técnica e com a concomitante redução gradual de 4,1% da produção *in vivo*, ao ponto que em 2016 ocorre a inversão entre as técnicas, fazendo com que a produção *in vitro* seja a maior em números produtivos no mundo (IETS 2018). No ano de 2020 a produção *in vitro* já representava 76,2% de toda a produção de embriões, o que reforça a tendencia do uso da tecnologia na reprodução assistida em bovinos (IETS 2020).

O histórico do Brasil na produção *in vitro* de embriões se inicia no ano de 1993, com o primeiro nascimento de um bezerro por meio da técnica (Rubin, 2005). Já na virada do século XXI o país se tornou destaque na produção comercial, sendo responsável por grande parte do que se produz de embriões PIVE no mundo, se mantendo responsável por cerca de 50% da produção mundial desde 2006 (Viana, 2018). Junto aos EUA, os dois países representaram 77,2% da produção mundial, com o Brasil chegando à marca de 366.253 embriões produzidos em 2020, sendo que desse montante 56,9% é oriundo de rebanhos leiteiros. (IETS 2020).

Esses números são em parte explicados pelas características do rebanho nacional, sendo ele baseado em animais de origem zebuína. Como característica desse tipo de animal, tem-se a maior produção de complexos cumulus-ovócito (COCs) e a melhor qualidade dessas estruturas (Pontes et al., 2011). Com isso a técnica de PIVE passa a se pagar através da diluição de custos investidos na execução da técnica, sendo que o rendimento por OPU é maior que em rebanhos taurinos e resultando em maiores produções de embriões (Viana, 2018).

O advento do uso da técnica no Brasil além de ser gradual, também se modificou ao longo dos anos. Inicialmente o seu uso foi basicamente voltado aos rebanhos de corte para reposição de animais de alto valor genético e com a finalidade de venda de animais melhoradores (Pontes et al., 2010). Porém, com o surgimento de técnicas eficazes de sexagem de sêmen, o produtor de leite passou a também utilizar a PIVE como ferramenta de reposição de seus animais, com o intuito de melhorar internamente seus índices produtivos e sem o inconveniente de ter nascimento de 50% de bezerros machos na fazenda (Rubessa et al., 2011).

2.2 Vantagens do uso comercial da PIVE

O emprego de biotecnologias como a PIVE promove um avanço genético considerável, tendo em vista que a técnica permite a coleta do material genético de doadoras antes mesmo do período puberal, em animais gestantes ou com deformidades no trato reprodutivo, que impedem a concepção por métodos convencionais (Galli et al., 2003, Currin et al., 2017), assim, junto ao uso de tecnologias de identificação de animais superiores, como é o caso da genômica, tem-se a possibilidade de um salto do ponto de vista genético, com um encurtamento do intervalo de gerações (Hayes et al., 2013).

Para a reposição de genética dentro de uma propriedade a PIVE desempenha um papel muito importante, pois através dela é possível direcionar acasalamentos com o uso não apenas da parte de genética paterna, mas sim de ambos os sexos (Watanabe et al., 2017). Além disso é possível potencializar o uso de doses de sêmen, principalmente para o uso de sêmen sexado (Sirard et al., 2018), característica que torna a técnica bastante atrativa principalmente em rebanhos leiteiros.

Outro ponto de destaque é a não necessidade de uso de protocolos hormonais em doadoras, diferentemente do que ocorre na técnica de produção *in vivo*, em que se expõe os animais a protocolos hormonais de difícil manejo e com repetidas aplicações de FSH. Além disso, a técnica conta com um método de coleta do material genético, a OPU já bem estabelecida e com altas taxas de recuperação de ovócitos (Perry et al., 2014), além de ser pouco invasivo ao animal quando comparado por exemplo ao método de laparoscopia, bastante utilizado no princípio do uso da técnica de PIVE (Santl et al., 1998).

Com o uso da técnica é possível potencializar a produção de descendentes com alto valor genético também em quantidade. Uma doadora com boa produção e conversão pode deixar mais de 50 descendentes em apenas um ano de aspirações, de modo que essa biotecnologia pode otimizar o melhoramento genético e promover redução do intervalo entre gerações (Wrenzycki, 2016).

2.3 Etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE)

2.3.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação ovocitária é um processo que se inicia ainda na vida fetal, com a ocorrência de uma série de meioses. Ao nascer, os ovócitos cessam as meioses e ficam parados no estágio de diplóteno (vesícula germinativa). Após o período puberal, já sob influência de hormônios reprodutivos, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), os ovócitos prosseguem o desenvolvimento com sucessivas meioses, até o interrompimento do desenvolvimento na metáfase II, no momento em que ocorre a ovulação (Monniaux et al., 2014).

A maturação ovocitária no ambiente *in vitro*, assim como no processo *in vivo*, depende do desenvolvimento nuclear, molecular e citoplasmático que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (Suh et al., 2002) e que no ambiente *in vitro* ocorre no

período de 22 a 24 horas (Parrish et al., 2014). A maturação do ponto de vista nuclear é caracterizada pela ruptura da vesícula germinativa, que depende da condensação da cromatina e da dissolução da membrana nuclear (Anguita et al., 2007). Esse processo é desencadeado pelo estímulo pré ovulatório de LH para que haja a ovulação (Lonengran et al., 2016).

O processo de maturação do ponto de vista citoplasmático ocorre através das alterações de organelas como a redução do complexo de golgi, aumento da concentração de lipídeos, compactação do nucléolo e alinhamento de grânulos corticais próximos à membrana do ovócito (Ferreira et al., 2009).

A composição dos meios comerciais de maturação varia substancialmente nos diversos fornecedores, no entanto, algumas substancias estão sempre presentes pois são imprescindíveis para o processo maturacional. A suplementação hormonal é importante para a maturação dos ovócitos, as gonadotrofinas estimulam a expansão de células do cumulus e a maturação nuclear, por meio da ativação de AMPc e outros mensageiros intracelulares (Li e Albertini., 2013).

A atmosfera gasosa do ambiente *in vitro* também é controlado visando mimetizar o ambiente materno que possui menor concentração de O₂ (1,5 a 8,5%) do que a tensão existente na atmosfera (20%). O controle de CO₂ também está presente nos sistemas de cultivo embrionário, visando controlar o potencial de hidrogênio de meios tamponados com bicarbonato (Bavister et al., 1995).

2.3.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

O processo da fecundação *in vitro* é a co-incubação de ovócitos maturados com espermatozoides devidamente capacitados para que o mesmo penetre à zona pelúcida do ovócito e gere um zigoto através da combinação do material genético, em um meio de fecundação (Oliveira et al., 2014). Primeiramente se faz necessária a capacitação espermática, que depende da remoção de fatores decapacitantes que estão presentes no fluido seminal e que ocorre no ambiente *in vivo* à medida que o espermatozoide passa pelo trato genital da vaca. Para mimetizar o ambiente materno, meios de fecundação contam com a presença da heparina (um tipo de glicosaminoglicano), que capacitam o espermatozoide no ambiente *in vitro* (Oliveira et al., 2014).

No momento da fecundação o espermatozoide entra em contato com os ovócitos e com a presença de cálcio no ambiente extracelular, o mesmo se liga à receptores da zona pelúcida, desencadeando a reação acrossomal, que nada mais é que a fusão entre as membranas plasmática e acrossomal (Oliveira et al., 2014). A partir desse evento o conteúdo acrossomal é liberado e junto à motilidade do espermatozoide, permite a penetração do mesmo no espaço perivitelínico (Oliveira et al., 2014).

Posteriormente ocorre a fusão das membranas plasmática do espermatozóide e a membrana vitelina do ovócito, com a posterior liberação de cálcio dentro do ovócito, que culmina na reação zonal, que é o enrijecimento da zona pelúcida que impede que ocorra a poliespermia (VARAGO et al., 2008).

Além do processo de capacitação espermática, tem-se a etapa da seleção dos espermatozoides, com intuito de separar a porção morta ou com baixo potencial fecundante, da porção capaz de realizar o processo de fecundação *in vitro* (Oliveira et al., 2014). Para isso foram desenvolvidos métodos como o gradiente de Percoll que é composto por partículas de sílica coloidal e polivinilpirrolidona, em diferentes concentrações que permitem essa separação eficiente dos espermatozoides (Gonsalves et al., 2002).

2.3.2 Cultivo *in vitro* (CIV)

A etapa do cultivo *in vitro* consiste no período pós fecundação e pré transferência dos embriões. Nesse momento importantes eventos culminam no desenvolvimento embrionário inicial, fundamental para o emprego eficiente da técnica, sendo as etapas mais importantes a clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação de células do trofoblasto e do embrioblasto, formação e expansão da blastocle e o rompimento da zona pelúcida (Oliveira et al., 2014).

O ponto crítico desse período de cultivo é a ativação do genoma embrionário, sendo que nessa etapa ocorre a dependência da expressão dos genes embrionários e não mais da expressão de genes oriundos dos ovócitos (origem materna) (Memili et al., 2000). A chamada transição materno-embrionária depende da ocorrência dos eventos: esgotamento dos transcritos maternos por degradação e tradução; substituição de

transcritos maternos em transcritos embrionários e a geração de transcritos específicos do embrião, tornando-o autossuficiente (Sirard et al., 2011).

Para o desenvolvimento satisfatório dos embriões é importante o uso do meio de cultivo que é baseado no meio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) enriquecido com aditivos como SFB (soro fetal bovino), BSA (Bovine Serum Albumin), aminoácidos, piruvato, lactato e glutamina (Oliveira et al., 2014).

2.4 Pontos críticos da PIVE

Apesar do avanço do uso da técnica e de seus benefícios, existem alguns pontos críticos importantes na produção que são foco de estudos, por impactar negativamente os resultados.

2.4.1 Fatores intrínsecos

A execução da técnica de produção *in vitro* por ser complexa e dependente de várias etapas, que gera por si só alguns fatores estressantes ao desenvolvimento embrionário. Do ponto de vista da qualidade embrionária após a maturação *in vitro*, se observa uma defasagem dos embriões PIVE em relação aos embriões produzidos *in vivo*, refletindo na redução da taxa de prenhez (Ferré et al., 2019). A manipulação em ambiente controlado gera um estresse ao embrião, o que afeta diretamente a qualidade da produção (Hansen et al., 2020).

Como já se sabe, embriões oriundos da PIVE possuem maior acúmulo intracelular de lipídios, o que reduz a criotolerância (Saragusty, 2010), além disso o processamento dos embriões provoca um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kitagawa et al., 2004) o que provoca redução na qualidade embrionária (Celi et al., 2011, 2012), reduz as taxas de prenhez de embriões transferidos e eleva as taxas de perda de gestação em receptoras (Talukder et al., 2017). Heras et al. (2016) demonstrou que existe influência do meio em que embrião se desenvolve (*in vivo*, *in vitro* com soro fetal ou sem) na expressão gênica dos embriões. Existe também uma diferença nos padrões de metilação do DNA observados em embriões de PIVE (Salilew-Wondim, et al., 2015), o que pode explicar os efeitos deletérios do uso da técnica. A cultura *in vitro* de embriões

também pode acarretar menor desempenho de prenhez em embriões transferidos, se comparado aos embriões *in vivo* (Ferraz, 2016).

Outro ponto de destaque para redução da qualidade embrionária está na heterogeneidade do pool de ovócitos aspirados no que se refere a sua maturidade citoplasmática e do ovócito em si (Mermillod et al., 1999). Em uma mesma coleta pode haver ovócitos oriundos de folículos antrais dominantes ou subordinados, de ondas foliculares ovulatórias ou anovulatórias, interferindo na capacidade de maturação (Hansen et al., 2020). Apesar do aparente sucesso na etapa de maturação, com cerca de 85% de ovócitos atingindo a maturidade ovocitária, ainda existe uma imaturidade nuclear que reflete nas etapas seguintes, sendo responsável por deficiências na fertilização e no desenvolvimento embrionário final (Calder et al., 2005).

Portanto, para que bons índices produtivos sejam obtidos com o uso da técnica, se faz necessário otimizar a coleta de ovócitos para que haja maior número total de embriões produzidos por aspiração, o que dilui custos e viabiliza o uso dessa tecnologia (Viana et al., 2010) pensando nisso, é importante utilizar animais que possuem maior população folicular com ovócitos competentes (Gimenes et al., 2008). Essas características são compartilhadas aos animais de origem zebuína ou cruzamentos que envolvem animais zebuínos, melhorando a eficiência produtiva em relação aos animais taurinos (Viana et al., 2010).

2.4.2 Fator Racial

A raça também é uma variável a ser considerada quando se refere à produção e também a conversão embrionária (Mello et al., 2016). O padrão racial pode influenciar na adoção de determinada biotecnologia como é o caso da PIVE. Animais *Bos indicus* possuem melhor resposta produtiva à PIVE (Pontes et al., 2010; Gimenes et al., 2014; Sales et al., 2015). Perfis hormonais e função ovariana de determinados grupos genéticos diferem entre si e modificam a resposta à produção *in vitro* (Sartori et al, 2016).

Em experimento realizado por Bastos et al., (2010), com vacas Holandesas e Nelore, descobriu que os zebuínos apresentam maior contagem de folículos antrais. Isso pode ser atribuído à maior concentração circulante de insulina nos Nelores, o que aumenta a disponibilidade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). O IGF-1 atua

diretamente no ambiente folicular, estimulando a proliferação de células da granulosa e a produção de hormônios esteroides, como o citocromo P450 A1 (CYP11A1) e a hidroxidelta-5-esteróide desidrogenase (HSD3B1). A insulina também reduz a expressão de enzimas que degradam a progesterona. Além disso, os zebuínos possuem uma maior concentração de colesterol circulante, que é um precursor desses hormônios. Esses fatores podem explicar os melhores resultados obtidos com a técnica de Produção In Vitro de Embriões (PIVE) em zebuínos (Sartori et al., 2016).

Outro fator que altera a circulação de hormônios reprodutivos é referente ao manejo nutricional dos animais e está diretamente relacionado ao consumo de matéria seca e ao metabolismo hepático principalmente de progesterona e estrôgeno (Sartori et al., 2016).

Animais zebuínos e taurinos, mesmo recebendo a mesma dieta, possuem perfis distintos de hormônios esteroides circulantes (Sartori et al., 2016). A resposta quanto a essa diferença parece estar na questão genética e não apenas no fator nutricional. Foi detectada uma relação entre os níveis de IGF 1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e a quantidade de enzimas hepáticas que degradam a progesterona circulante (Sidhu & Omiecinski, 1999). Em zebuínos, os níveis de IGF1 e insulina são maiores, o que reduz a concentração de enzimas degradadoras de progesterona, o que por sua vez, permite maior concentração de P4 circulante nesses animais (Sartori et al., 2016).

O hormônio anti-mülleriano (AMH) parece ser também um marcador válido para população folicular, possuindo uma relação positiva para essa característica (Baldrighi et al., 2014). Em animais *Bos Indicus* a concentração de AMH encontrada foi maior que em animais *Bos Taurus* e bubalinos mantidos em mesmo ambiente e dieta (Sartori et al., 2016), isso possibilita associar tal hormônio à maiores rendimentos observados em *Bos Indicus* no processo da PIVE. O mesmo autor também observou maior percentual de ovócitos atresicos em animais com menor concentração circulante de AMH, o que pode explicar a relação positiva entre a contagem de folículos antrais e tal hormônio (Baldrighi et al., 2014)

2.4.3 Sazonalidade

A questão da sazonalidade também impacta na condição produtiva e reprodutiva dos animais embora existam raças que sofrem mais o efeito dos intemperes climáticos, o que reflete na produção ovócitaria e também na conversão embrionária (Dupont et al., 2014). Animais *Bos Taurus* obtiveram resultados inferiores nas taxas de produção de blastocisto (Watanabe et al., 2017), o que pode estar relacionado com a menor capacidade adaptativa desses animais ao estresse térmico (Roth, 2008; Ferreira et al., 2013) e também ao impacto da restrição alimentar em períodos de escassez hídrica em animais com maiores exigências nutricionais (Watanabe et al., 2017).

Para rebanhos leiteiros o efeito do clima sobre a eficiência reprodutiva é ainda mais pronunciado, tendo em vista a seleção desses animais para a produção de leite, além do uso de cruzamentos de animais zebuínos com taurinos (Roth et al., 2017). O fator nutricional também está relacionado com a sazonalidade, pois em sistemas extensivos o uso de pastagens como fonte de alimento pode comprometer o desempenho reprodutivo no período seco (Watanabe et al., 2017).

Os mamíferos de forma geral se utilizam de três princípios físicos básicos para o controle da temperatura corporal, sendo eles: a condução, convecção e radiação. Quando a temperatura ultrapassa a temperatura corporal, o animal mantém a homeostase com esses mecanismos (ZviRoth 2020). No entanto, esse controle é limitado e quando a temperatura continua a subir, tais mecanismos não são suficientes, sendo necessárias outras vias alternativas como é o caso de trocas de calor via transpiração e respiração ofegante (ZviRoth 2020).

Se ainda o animal se mantém em desconforto térmico, existe um terceiro mecanismo para redução da produção de calor metabólico, através da redução do consumo de matéria seca e o aumento do consumo de água. Esse último mecanismo por sua vez, atua diretamente na produtividade do animal, interferindo negativamente nos parâmetros como produção de leite e ganho de peso (Wolfenson, D., & Roth, Z. 2019), além de prejuízo aos parâmetros reprodutivos (Collier et al., 2019).

O efeito negativo do estresse térmico sobre a reprodução já foi descrito por diversos autores, como do ponto de vista endocrinológico, se observa uma alteração nos níveis circulantes dos principais hormônios reprodutivos (Lussier et al., 1987). A principal mudança nos padrões hormonais é a redução dos níveis de estrógeno e inibina (Roth et al,2000) do fluido folicular, associada ao aumento do nível circulante de FSH

(Roth et al., 2000), que reduzem a capacidade ovulatória de folículos, através da redução da amplitude do pico de produção do LH que também interfere negativamente na maturação ovocitária, que por consequência reduz a viabilidade embrionária (Bridges et al., 2005).

O efeito do estresse calórico sobre a reprodução também ocorre do ponto de vista molecular, prejudicando o desenvolvimento ovocitário desde a foliculogênese (Roth et al., 2017). No entanto, o momento mais sensível ao estresse térmico dentro do desenvolvimento folicular, além dos mecanismos que afetam a competência ovocitária ainda não está claro e precisa ser investigado (Roth et al., 2017).

Ao nascer, um ovário bovino possui um número finito de folículos primordiais, que se desenvolvem em grupos (pools) durante a vida reprodutiva do animal (Roth et al., 2017). O desenvolvimento de cada grupo de ovócitos é um processo lento de cerca de 90 dias (Lussier et al., 1987). Portanto, o estresse térmico sofrido pelo animal pode refletir em queda de parâmetros reprodutivos mesmo após o final do período quente.

O durante o desenvolvimento folicular e conseqüentemente ovocitário o folículo parte do estágio primordial até atingir o estágio pré ovulatório (De Rensis., 2021). O período de transição entre folículos primários e secundários parece ser o ponto crítico de comunicação celular que prepara o folículo para se tornar receptivo às gonadotrofinas que modularão o processo final de desenvolvimento folicular (Roth, 2017) e nesse momento a submissão ao estresse térmico parece acarretar deficiência da comunicação endócrina que garante a competência ovocitária e conseqüentemente a viabilidade embrionária subsequente (De Rensis., 2021).

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado com base nos dados fornecidos pela empresa comercial de assessoria reprodutiva de bovinos, situada no município de Uberlândia MG. As análises realizadas foram extraídas do banco de dados da empresa em planilhas de Excel, considerando toda a produção do laboratório comercial de produção de embriões no ano de 2021.

A partir da coleta dos dados algumas variáveis de interesse foram filtradas para que fosse feito o tratamento e estatística das informações. Foram avaliados um total de 1.198 animais submetidos à OPU sendo 670 da raça Gir e 528 da raça Girolando, o que resultou em um total de 27.135 ovócitos viáveis, sendo 14.440 da raça Gir e 12.695 da raça Girolando. No período de análise foram transferidos 4.483 embriões, sendo 2.536 da raça Gir e 1.947 da raça Girolando, em receptoras previamente sincronizadas com protocolos hormonais a base de progesterona e estrógeno.

Posteriormente foi feito o agrupamento das aspirações de acordo com diferentes períodos do ano, sendo eles: Período seco (01/04/2021 - 30/09/2021) e período chuvoso (01/01/2021 - 31/03/2021 e 01/10/2021 - 31/12/2021). As variáveis resposta analisados foram produção de ovócitos viáveis, a produção de blastocistos no dia (D7) e a prenhez por transferência (P/TE) das receptoras de embriões.

As variáveis número de ovócitos viáveis e de embriões produzidos foram analisados por análise de variância e prenhez por transferência das receptoras foi analisada por regressão logística, ambos no programa MINITAB, sendo incluído no modelo raça da doadora e estação do ano no momento da aspiração folicular, bem como a interação raça vs. estação do ano. A significância estatística foi definida como $P \leq 0,05$ e tendência foi definida como $0,05 < P \leq 0,10$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo a recuperação de ovócitos viáveis por OPU foi influenciada pela raça da doadora apenas no período seco do ano, sendo que foram recuperados menos ovócitos por OPU nas fêmeas Gir em comparação as fêmeas Girolando (Tabela 1). Os valores médios de ovócitos viáveis aspirados se assemelharam aos resultados encontrados por Watanabe et al. (2016) para raça Gir, porém diferiu da maior parte dos trabalhos que realizaram essa análise (Pontes et al., 2011; Moschini et al., 2021; Oliveira et al., 2019).

Tabela 1. Efeito da interação do período do ano no momento da aspiração com a da raça da doadora no número de ovócitos recuperados por OPU, número de embriões viáveis e taxa de produção de embrião. Uberlândia, MG, 2022.

Período do Ano	Raça da Doadora (n)	Ovócitos Viáveis	Embriões Viáveis	Produção de Embrião (%)
Chuvoso	Gir (303)	24,10 ± 0,971	7,18 ± 0,406	29,2
	Girolanda (198)	24,54 ± 0,859	7,50 ± 0,462	30,8
Seco	Gir (362)	19,43 ± 0,792 ^a	5,75 ± 0,283 ^a	32,2
	Girolanda (327)	23,58 ± 0,789 ^b	8,85 ± 0,425 ^b	35,5
P-Valor		0,0001	0,0001	0,506

^{a, b} números com sobrescritos diferentes na mesma coluna diferem entre si (P = 0001)

No período seco foi encontrado maior recuperação de ovócitos viáveis nas fêmeas Girolando, o que indica uma interação da ambiência na produção de ovócitos para animais provavelmente melhor manejados no período seco do ano e com suplementação, como é o caso da raça Girolanda. Pontes et al. (2010), realizaram a mesma análise para a raça Girolanda, nas diferentes composições genéticas (GO $\frac{1}{2}$ 24,3; GO $\frac{3}{4}$ 16,8), com maior recuperação de ovócitos para animais com maior participação da raça zebuína. A influência do período do ano sobre o número médio de ovócitos recuperados não foi analisada no estudo. Os resultados de recuperação de ovócitos viáveis do presente estudo vão contra a premissa de que animais zebuínos tendem ter maior contagem folículos ovarianos antrais (Sartori et al., 2016).

A diferença observada apenas no período seco é um indício de que a ambiência dos animais interfere na população folicular e conseqüentemente na produção de ovócitos viáveis (Dupont et al., 2014). Associado à essa condição existe a diferença na nutrição dos animais mantidos à pasto no período seco, que poderia interferir na fisiologia reprodutiva das doadoras. Apesar do conhecimento de que a nutrição interfere diretamente na reprodução (Watanabe et al., 2017), a ausência de dados sobre o manejo nutricional dos animais do presente estudo, não permite inferências a esse respeito.

Apesar de não ter sido encontrado estudos que relatam a influência da heterose nesse parâmetro específico de recuperação de ovócitos, existem estudos que relatam incremento de fertilidade em animais cruzados (Jayawardana et al., 2023). Por tanto, é possível que a composição genética possa ter interferido nos resultados.

Na análise da produção média de embriões viáveis por sessão de OPU, foi possível encontrar o mesmo efeito da interação entre o período do ano e a raça da doadora sendo a produção de embriões foi maior para doadoras Girolando em comparação com doadoras Gir ($8,85 \pm 0,425$ vs $5,75 \pm 0,283$; Tabela 1) no período seco do ano, sendo um resultado esperado pois também foi recuperado maior proporção de ovócitos viáveis para esses animais nesse período. Demais fatores, como ambiência e o vigor híbrido dos animais mestiços também podem ter influenciado na maior produção de embrião viável.

Apesar do efeito da interação período do ano e raça das doadoras de ovócitos ter sido detectado para recuperação de ovócitos viáveis e produção de embriões viáveis, não foi observado efeito dessa interação sobre a taxa de embriões produzidos (Tabela 1), provavelmente isso ocorreu devido ao fato de que este parâmetro depende bastante das condições laboratoriais (Demétrio et al., 2020).

Como não foi detectado efeito da interação da estação do ano no momento aspiração e a raça do embrião na P/TE, os dados serão apresentados de acordo com efeito da estação do ano no momento transferência e raça do embrião.

A P/TE não sofreu efeito do período do ano, não apresentando diferença significativa entre as estações chuvosa e seca. Questões de manejo como o confinamento dos animais, podem reduzir a influência das chuvas e conseqüentemente da oferta de forragem no desempenho reprodutivo dos animais. Já a raça do embrião afetou a P/TE, sendo superior para a raça Gir (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito da estação do ano no momento da transferência do embrião sobre a prenhez por transferência de embriões. Uberlândia, MG, 2022.

Estação do Ano	Número de Transferências	Prenhez/TE (%)
Primavera/Verão	821	45,92
Outono/Inverno	1145	46,64
P-Valor		0,753

Tabela 3. Efeito da raça do embrião sobre a prenhez por transferência de embriões. Uberlândia, MG, 2022.

Raça do Embrião	Número de Transferências	Prenhez/TE (%)
Gir	858	49,18
Girolanda	1108	44,13
P-Valor		0,026

Assim como na produção de ovócitos viáveis e na produção de embriões, a P/TE está sujeita às condições ambientais e de manejo, com o agravante de haver nesse caso, a variável receptora, que deve ser considerada para análise dos resultados. Quanto a raça do embrião, tem-se a influência da composição genética e também do sêmen utilizado para a fecundação *in vitro*, sendo que o efeito paterno também impacta diretamente na taxa de prenhez, por existir relação entre a qualidade do sêmen e a capacidade de desenvolvimento embrionário (Tesarik, 2005).

Diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, Andrade et al. (2012) não identificou influência da raça do embrião, na P/TE. No entanto, no presente estudo foi possível identificar essa diferença, o que indica que o genótipo da doadora provavelmente influencia a P/TE pois sabe-se que existem diferenças na fisiologia reprodutiva de animais de raças distintas (Gir ou Girolando), o que poderia influenciar na qualidade do embrião produzido e conseqüentemente, na P/TE.

A P/TE do presente estudo pode ser considerada satisfatória levando em consideração a variabilidade dos animais submetidos à transferência de embriões e na não uniformidade do controle hormonal, sanitário e nutricional das receptoras que compõem diversos rebanhos utilizados. Pontes et al. (2010) avaliaram a P/TE em três raças (Gir: 40%; Holandês: 36%; Girolando: 37%), encontrando resultados inferiores aos do presente estudo, a diferença identificada por ela para a P/TE em diferentes composições genéticas pode ser uma contribuição para respaldar futuros estudos à respeito da influência racial na produção *in vitro* de embriões bovinos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a doadora de Gir produz menor número de ovócitos e embriões viáveis por aspiração no período seco do ano, e os embriões da raça Gir resultam em maior prenhez por transferência de embrião em qualquer período do ano.

REFERENCIAS

- Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wettemann RP. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* 2000; 78:1291-302.
- Andrade, G. A., Fernandes, M. A., Knychala, R. M., Pereira Junior, M. V., Oliveira, A. J., Nunes, D. P., ... & Santos, R. M. (2012). Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(1), 66-69.
- Anguita, B., Jimenez-Macedo, A. R., Izquierdo, D., Mogas, T., & Paramio, M. T. (2007). Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 67(3), 526-536.
- Baldrighi, J. M., Sá Filho, M. F. D., Batista, E. D. O. S., Lopes, R. N. V. R., Visintin, J. A., Baruselli, P. S., & Assumpção, M. E. O. A. (2014). Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reproduction in domestic animals*, 49(6), 1015-1020.
- Bastos, M. R., Mattos, M. C. C., Meschiatti, M. A. P., Surjus, R. S., Guardieiro, M. M., Mourão, G. B., ... & Sartori, R. (2010). Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(Suppl 2), 776.
- Becher, B., Neto, A. P., Gregianini, H. G., Mota, M. F., Gregianini, J. T. F., Cattelan, J., ... & Jelonschek, J. P. (2020). Performance of zebu donor cows *in vitro* production of embryos. *Brazilian Journal of Development*, 6(2), 7788-7800.
- Betteridge K. 1981. An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 62:1-13
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-58
- Bridges, P. J., Brusie, M. A., & Fortune, J. E. (2005). Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domestic animal endocrinology*, 29(3), 508-522.
- Caldas-Bussiere, M. C., Jr, V. L. M., & Maretto, V. (2021). A L-arginina na produção *in vitro* de embriões bovinos: perspectivas para o futuro. *Rev Bras Reprod Anim*, 45(4), 600-607.
- Calder, M. D., Caveney, A. N., Sirard, M. A., & Watson, A. J. (2005). Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertility and Sterility*, 83(4), 1077-1085.

- Currin, L., Michalovic, L., Bellefleur, A.-M., Gutierrez, K., Glanzner, W., Schuermann, Y., ... Bordignon, V. (2017). The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the *in vitro* embryo development of Holstein calf oocytes. *Theriogenology*, 104, 87–93. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.
- De Rensis, F., Saleri, R., Garcia-Ispuerto, I., Scaramuzzi, R., & López-Gatius, F. (2021). Effects of heat stress on follicular physiology in dairy cows. *Animals*, 11(12), 3406.
- Dupont, J., Scaramuzzi, R. J., & Reverchon, M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *animal*, 8(7), 1031-1044.
- Fair, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* 2003, 78, 203–216.
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P. N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E., ... & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of reproduction*, 78(4), 761-772.
- Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, Santos JE, et al., 2016. 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* 86:1834–41
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J (2020). Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. D. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836-848.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I and Lazzari G 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599–616.
- Gimenes L.U., Sá Filho M.F., Carvalho N.A., Torres-Júnior J.R., Souza A.H., Madureira E.H., Trinca L.A., Sartorelli E.S., Barros C.M., Carvalho J.B., Mapletoft R.J. & Baruselli P.S. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 69: 852-858.
- Gimenes, L. U., Ferraz, M. L., Fantinato-Neto, P., Chiaratti, M. R., Mesquita, L. G., Sá Filho, M. F., ... & Baruselli, P. S. (2015). The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, 83(3), 385-393.
- Gonçalves, P. B. D., Visintin, J. A., Oliveira, M. A. L. D., Montagner, M. M., & Costa, L. F. S. D. (2002). Produção *in vitro* de embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*

Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 753–758.

Hansen, Peter J. "Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals." *Annual review of animal biosciences* 8 (2020): 395-413.

Hayes BJ, Lewin HA, Goddard ME. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in Genetics*. 2013; 29:206-14.

Heras S, De Coninck DI, Van Poucke M, Goossens K, Bogado Pascottini O, et al., 2016. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC Genom.* 17:72. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2393-z>.

International Embryo Transfer Society (IETS). Statistics and data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsl* 2020; 30:16–26.

Jayawardana, J. M. D. R., Lopez-Villalobos, N., Hickson, R. E., & McNaughton, L. R. (2023). Estimation of genetic parameters and individual and maternal breed, heterosis, and recombination loss effects for production and fertility traits of spring-calved cows milked once daily or twice daily in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 364-380.

Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A., & Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62(7), 1186-1197.

Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(3), 141-152.

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 81:301–7.

Mello, R. R. C., Mello, M. R. B. D., Sousa, S. L. G. D., & Ferreira, J. E. (2016). Parameters of *in vitro* embryo production of the Sindhi breed. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51, 1773-1779.

Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, 8(1), 87–96.

Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognie, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT-*, 449-460.

- Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014). The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?. *Biology of reproduction*, 90(4), 85-1.
- Moschini, G. A., Gaitkoski, D., de Almeida, A. B. M., Hidalgo, M. M. T., Martins, M. I. M., Blaschi, W., & Barreiros, T. R. R. (2021). Comparison between *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Research, Society and Development*, 10(7), e38810716712-e38810716712.
- Naves, A. C. (2020). Influência do ambiente na qualidade de oócitos, produção *in vitro* de embriões e na taxa de prenhez em taurinos, zebuínos e adaptados.
- Oliveira, C. S., Sarapião, R. V., & Quintão, C. C. R. (2014). Biotécnicas da reprodução em bovinos. 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite.
- Oliveira, C. S., Serapiao, R. V., dos Reis Camargo, A. J., de Freitas, C., Iguma, L. T., Carvalho, B. C., ... & da Silva Verneque, R. (2019). Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*)-Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. *Animal Reproduction Science*, 209, 106165.
- Parrish, J. J. (2014). Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67-73.
- Perry G. 2014. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transf. Newsl.* 32:14–26
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM and Taverne MAM 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751–762.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010; 74:1349-55.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2000). 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*, 120(1), 83-90.
- Roth, Z. (2017). Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 151-170.
- Rubessa, M., Boccia, L., Campanile, G., Longobardi, V., Albarella, S., Tateo, A., ... & Gasparini, B. (2011). Effect of energy source during culture on *in vitro* embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. *Theriogenology*, 76(7), 1347-1355.
- Rubin MIB. 2005. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005). *Acta Sci Vet*, 33: 35-54.

Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintao CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci* 2015; 98:3086-99.

Salilew-Wondim, D., Fournier, E., Hoelker, M., Saeed-Zidane, M., Tholen, E., Looft, C., ... Tesfaye, D. (2015). Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development *In Vitro*. *PLOS ONE*, 10(11), e0140467.
doi:10.1371/journal.pone.0140467

Santos JEP, Cerri RLA, Sartori R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 2008; 69:88-97.

Saragusty, J., & Arav, A. (2010). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1–19.
doi:10.1530/rep-10-0236.

Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, Bastos MR, Nascimento AB. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Anim Reprod* 2013;10:199-205.

Sartori, R., Gimenes, L. U., Monteiro Jr, P. L., Melo, L. F., Baruselli, P. S., & Bastos, M. R. (2016). Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86(1), 32-40.

Sidhu, J. S., & Omiecinski, C. J. (1999). Insulin-mediated modulation of cytochrome P450 gene induction profiles in primary rat hepatocyte cultures. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 13(1), 1-9.

Silva, J. C. B., Ferreira, R. M., Maturana Filho, M., de Rezende Naves, J., Santin, T., Pugliesi, G., & Madureira, E. H. (2017). Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and *in vitro* embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 90, 65-73.

Sirard, M. A. (2011). Activation of the embryonic genome. *Reproduction in Domestic Ruminants*, 7, 145-158.

Sirard, M. A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 156(1), R1-R7.

Stephoe PC, Edwards RG. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2(8085):366

Suh, C. S., Sonntag, B., & Erickson, G. F. (2002). The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3(1), 5.

Talukder, S., Kerrisk, K. L., Gabai, G., & Celi, P. (2017). Role of oxidant–antioxidant balance in reproduction of domestic animals. *Animal Production Science*, 57(8), 1588.
doi:10.1071/an15619

- Tesarik, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproduction Biomedicine Online*, v. 10, p. 226-230, 2005. Disponível em: <[https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)61798-1/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)61798-1/pdf)>. doi:10.1016/S1472-6483(10)61798-1.
- Thibier M. 2000. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: a new record for bovine *in vivo*-derived embryos transferred. *Embryo Transf. Newsl.* 18(4):24–28
- Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. 2010. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Sci Vet*, 38:s661-s674.
- Viana, J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), 17.
- Watanabe, Y. F., de Souza, A. H., Mingoti, R. D., Ferreira, R. M., Batista, E. O. S., Dayan, A., ... & Baruselli, P. S. (2018). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction (AR)*, 14(3), 635-644.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 2004;82:63-74.
- Wolfenson, D., & Roth, Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1), 32-38.
- Wrenzycki, C. (2016). Sistemas de cultivo *in vitro*: quanto longe estamos das condições ideais? *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 155.