



LORENA LIMA FIRMINO

**EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
DE DOADORAS E TOUROS HOLÂNDES, GIR E
GIROLANDO EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO**

**LAVRAS-MG
2024**

LORENA LIMA FIRMINO

**EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE DOADORAS E
TOUROS HOLÂNDES, GIR E GIROLANDO EM DIFERENTES ESTAÇÕES
DO ANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal para obtenção de título de Mestre

Prof. Dr. Nadja Gomes Alves
Orientadora

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Firmino, Lorena Lima.

Eficiência da produção *in vitro* de embriões de doadoras e touros Holandês, Gir e Girolando em diferentes estações do ano / Lorena Lima Firmino. - 2024.

68 p. : il.

Orientador(a): Nadja Gomes Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Blastocistos. 2. Raça. 3. Oócitos. I. Alves, Nadja Gomes. II. Título.

LORENA LIMA FIRMINO

**EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE DOADORAS E
TOUROS HOLÂNDES, GIR E GIROLANDO EM DIFERENTES ESTAÇÕES
DO ANO**

**IN VITRO EMBRYO PRODUCTION EFFICIENCY FROM HOLSTEIN, GIR
AND GIROLANDO DONOR COWS AND BULLS IN DIFFERENT SEASONS
OF THE YEAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 17 de julho de 2023.

Dra. Nadja Gomes Alves – Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária - UFLA

Dr. Renato Ribeiro de Lima – Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas - Departamento de Estatística - UFLA

Dr. José Camisão de Souza – Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária - UFLA

Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Gado de Leite)

Prof. Dra. Nadja Gomes Alves

Orientadora

LAVRAS, MG

2024

AGRADECIMENTOS

À Deus eu agradeço por guiar meus passos e me permitir chegar até aqui. Aos meus familiares, deixo meus mais sinceros agradecimentos pelo constante apoio, orações e torcida. Ao meu esposo, por abraçar todos os meus sonhos e caminhar junto comigo, obrigada por todo companheirismo.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras pela estrutura ofertada e acolhimento durante todos esses anos, ao corpo docente da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária pelos ensinamentos e mentorias ao longo do processo. Agradeço também ao PPGCV e toda a coordenação do programa pela oportunidade de realizar meu mestrado, pelas orientações e apoio recebido.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela concessão de bolsa de estudos durante uma parte do período de Mestrado.

À equipe do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos – AGROOPEGEN de Pouso Alegre/Minas Gerais, em especial ao João Pedro Campos, sempre solícito, presente e paciente, e ao Felipe Costa Gonçalves pelo apoio, compreensão e acolhimento. Vocês foram parte fundamental do processo.

À minha orientadora, Profa. Nadja Gomes Alves, não somente pela orientação, mas pela paciência, compreensão e amizade, agradeço ainda pela condução de todo o processo de realização do projeto, pela força de vontade em ajudar e incentivo constante, pelo exemplo de mulher, profissional e ser humano.

Aos membros componentes da banca examinadora, Luiz Gustavo Bruno Siqueira, José Camisão de Souza pelas valiosas contribuições e, em especial, ao professor Renato Ribeiro de Lima pela realização das análises estatísticas.

Aos meus colegas de equipe de pós-graduação, Rafael, Brenda, Letícia e Clara, pelas experiências trocadas, conselhos e ajuda fundamentais. A todos os membros do NUTRAN e alunos de iniciação científica, que tanto me auxiliaram.

RESUMO GERAL

O mercado da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos tem se expandido nos últimos anos, ultrapassando até mesmo os números da produção *in vivo*. A PIVE consiste na obtenção de oócitos de vacas *in vivo*, por meio da técnica de *ovum-pick-up* (OPU), maturação e fertilização dos oócitos e cultivo *in vitro* dos prováveis zigotos, que podem ser transferidos para receptoras ou criopreservados. Entretanto, muitos fatores podem interferir no sucesso da técnica, sejam estes relacionados à vaca doadora, ao touro, ao ambiente e aos processos laboratoriais. Este estudo tem como objetivo analisar alguns fatores que podem interferir nos resultados da PIVE de vacas leiteiras. O banco de dados analisado é proveniente de um laboratório comercial e incluiu informações relacionadas à 934 rotinas de PIVE. As informações contidas no banco de dados incluem os grupamentos genéticos da doadora e do touro, quais sejam, Holandês (HO), Gir e mestiços $\frac{3}{4}$ Holandês x Zebu (Girolando), fazenda, estação do ano em que foi realizada a OPU, nome do touro, número de oócitos viáveis, desnudos e irregulares coletados, maturados e cultivados, número de embriões clivados e número de embriões produzidos. Todas as sessões de OPU, assim como todas as rotinas de PIVE foram realizadas por um único técnico e em todas as rotinas foi utilizado sêmen sexado de fêmea. Os dados foram analisados por modelos lineares generalizados no software SAS (OnDmand for Academics, v.9.4) e efeito significativo foi assumido quando $P < 0,05$. O número total de oócitos obtidos foi de $12,57 \pm 0,76$; $18,11 \pm 1,23$; $20,85 \pm 1,58$ em doadoras HO, Gir e Girolando, respectivamente. Doadoras HO produziram menos ($P < 0,05$) oócitos viáveis do que as doadoras Gir e Girolando. Doadoras HO produziram mais ($P < 0,05$) oócitos viáveis no inverno ($5,18 \pm 0,47$) do que na primavera ($3,96 \pm 0,40$), verão ($4,94 \pm 0,57$) e outono ($4,18 \pm 0,46$), contudo, as estações do ano não influenciaram ($P > 0,05$) o número de oócitos viáveis coletados de doadoras Gir e Girolando (Interação entre a raça da doadora e a estação, $P < 0,05$). O grupamento genético do touro dentro da combinação grupamento genético da doadora x estação do ano influenciou a taxa de clivagem (TC, $P < 0,05$) e de embriões produzidos em relação ao total de oócitos ($P < 0,05$) e em relação a embriões clivados ($P < 0,05$). A TC de embriões com genótipo HO x HO não diferiu ($P > 0,05$) entre as estações do ano, contudo, a TC de embriões com genótipo HO X Gir foi maior ($P < 0,05$) na primavera ($58,31 \pm 2,95\%$) do que no inverno ($45,05 \pm 2,54\%$). A TC de doadoras Girolando e a taxa de produção de embriões de doadoras Gir, no inverno, foram reduzidas ($P < 0,05$) pela utilização de sêmen de touros do mesmo grupamento genético da doadora. As taxas de clivagem e de produção de embriões de doadoras HO e Gir variaram em função do touro utilizado na fertilização. Estes achados fornecem uma base para o desenvolvimento de estratégias personalizadas que maximizem o sucesso da técnica e, por conseguinte, aprimorem o desempenho reprodutivo e avanço genético dos rebanhos leiteiros.

Palavras-chave: Blastocistos. Estação do ano. Oócitos. Raça. Taxa de clivagem.

GENERAL ABSTRACT

The market for *in vitro* production of bovine embryos (IVP) has expanded in recent years, surpassing even the figures for *in vivo* production. IVP consists of obtaining oocytes from cows *in vivo*, by means of the ovum-pick-up (OPU) technique, maturation and fertilization of oocytes, and *in vitro* culture of putative zygotes, which can be transferred to recipients or cryopreserved. However, many factors can interfere with the success of the technique, whether related to the donor cow, the sire, the environment, or laboratory procedures. This study aims to analyze some factors that may affect the outcomes of IVP in dairy cows. The analyzed database comes from a commercial laboratory and includes information related to 934 IVP routines. The database contained information about the genetic groups of the donor and sires, namely, Holstein (HO), Gir, and $\frac{3}{4}$ Holstein x Zebu crosses (Girolando), farm, season in which the OPU was performed, and numbers of viable, denuded, and irregular oocytes. Additionally, the numbers of matured, cultivated, cleaved, and total embryos produced were recorded. All OPU sessions, as well as all IVP routines were performed by a single technician, and sex-sorted-semen (female) was used in all routines. Data were analyzed by generalized linear models in SAS[®] software (OnDmand for Academics, v.9.4) and a significant effect was assumed when $P < 0.05$. The total numbers of oocytes were 12.57 ± 0.76 , 18.11 ± 1.23 , and 20.85 ± 1.58 from HO, Gir, and Girolando donors, respectively. HO donors produced fewer ($P < 0.05$) viable oocytes than Gir and Girolando donors. HO donors produced more ($P < 0.05$) viable oocytes in the winter (5.18 ± 0.47) than in the spring (3.96 ± 0.40), summer (4.94 ± 0.57), and autumn (4.18 ± 0.46) seasons; however, season did not influence ($P > 0.05$) the number of viable oocytes from Gir and Girolando donors (interactive effect between donor breed and season, $P < 0.05$). Sire genetic group within donor genetic group x season combination influenced the cleavage rate (CR, $P < 0.05$) and the production of embryos in relation to the total oocytes ($P < 0.05$), and to the cleaved embryos ($P < 0.05$). The CR of HO x HO embryos did not differ ($P > 0.05$) between seasons; however, the CR of HO x Gir embryos was higher ($P < 0.05$) in the spring ($58.31 \pm 2.95\%$) than in the winter ($45.05 \pm 2.54\%$). The CR of Girolando donors and the embryo production rate of Gir donors in the winter were reduced ($P < 0.05$) by using semen from sires of the same genetic group as the donors. The cleavage and embryo production rates of HO and Gir donors varied depending on the bull used for fertilization. These findings provide a basis for the development of personalized strategies that maximize the success of the technique and, consequently, improve the reproductive performance and genetic progress in dairy herds.

Keywords: Blastocysts. Seasons. Oocytes. Breed. Cleavage rate.

LISTA DE SIGLAS

AGNE - Ácidos graxos não esterificados
AMH - Hormônio antimülleriano
ATP - Adenosina trifosfato
CFA - Contagem folicular antral
CIV – Cultivo in vitro
CL - Corpo lúteo
COCs - Complexos *cummulus oophorus*
ECC - Escore de condição corporal
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
EROS - espécies reativas de oxigênio
FD - Folículo dominante
FIV – Fertilização in vitro
FSH - Hormônio folículo estimulante
GG - Grupamento genético
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
HO - Holandês
IETS - Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1
MIV - Maturação *in vitro*
OPU - *Ovum pick-up*
P4 – Progesterona
PIVE - Produção in vitro de embriões
TC - Taxa de clivagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número e porcentagem de oócitos viáveis coletados de vacas leiteiras nas estações do ano (<i>lsmeans</i> ± erro padrão).....	50
Tabela 2 – Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na taxa de clivagem em relação ao total de oócitos (<i>lsmeans</i> ± erro padrão).....	52
Tabela 3 – Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na taxa de embriões produzidos em relação ao total de oócitos (<i>lsmeans</i> ± erro padrão).....	53
Tabela 4 - Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na taxa de embriões produzidos em relação ao número de embriões clivados (<i>lsmeans</i> ± erro padrão).....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de clivagem de embriões em relação ao número de oócitos de doadoras Holandês fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir.....	56
Figura 2 – Taxa de clivagem de embriões em relação ao número de oócitos de doadoras Gir fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir.....	57
Figura 3 - Taxa de embriões produzidos em relação ao número de oócitos de doadoras Holandês fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir.....	57
Figura 4 - Taxa de embriões produzidos em relação ao número de oócitos de doadoras Gir fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir.....	58

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 PRINCIPAIS FATORES QUE DETERMINAM O SUCESSO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	13
2.1.1 Fatores relacionados à doadora	13
2.1.1.1 Grupo genético da doadora.....	13
2.1.1.2 Idade da doadora	15
2.1.1.3 Qualidade dos oócitos produzidos pela doadora.....	16
2.1.1.4 Estado nutricional e metabólico da doadora.....	16
2.1.1.5 Fase do ciclo estral e status hormonal da doadora	18
2.1.2 Fatores ambientais	20
2.1.3.1 Estresse térmico	20
2.1.3 Fatores relacionados a técnica.....	22
2.1.3.1 Ovum-pick up e intervalos entre a sessões	22
2.1.3.2 Estresse oxidativo	23
2.1.4 Fatores relacionados ao touro.....	25
2.1.4.1 Touro.....	25
2.4.1.2 Tipo de Sêmen	26
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
SEGUNDA PARTE	43
ARTIGO CIENTÍFICO DE ACORDO COM REGRAS DA REVISTA THERIOGENOLOGY (VERSÃO SUBMISSÃO).....	43
EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE DOADORAS E TOUROS HOLANDÊS, GIR E GIROLANDO EM CLIMA TROPICAL.....	43
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 BANCO DE DADOS	46
2.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR, CLASSIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE OÓCITOS.....	47
2.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	48
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
2.4.1 Número total de oócitos, número de oócitos viáveis e porcentagem de oócitos viáveis.....	49
2.4.2 Taxas de clivagem e de produção de embriões.....	50
2.4.2.1 Efeito da raça do touro.....	50
2.4.2.2 Efeito individual de touro.....	50

3.	RESULTADOS.....	50
3.1	NÚMERO TOTAL DE OÓCITOS, NÚMERO DE OÓCITOS VIÁVEIS E PORCENTAGEM DE OÓCITOS VIÁVEIS.....	50
3.2	TAXAS DE CLIVAGEM E DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	52
4.	DISCUSSÃO	58
5.	CONCLUSÃO.....	60

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos tornou-se disponível no final da década de 1980 (PIETERSE et al., 1988), e desde então, seu crescimento foi constante, ultrapassando até mesmo o número de embriões produzidos *in vivo* (FERRÉ et al., 2020). De acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS, 2019), 80% dos embriões bovinos transferidos no mundo advém da produção *in vitro*. No caso da pecuária leiteira, que tem grande importância na produção global de alimentos, o melhoramento genético se torna essencial, e neste caso, a PIVE se torna uma grande aliada. Associado ao crescimento da PIVE, novas biotecnologias da reprodução também se tornaram disponíveis, como o uso de sêmen sexado (JOHNSON, 1995) e a seleção genômica (KASINATHAN et al., 2015; WELCH; JOHNSON, 1999), justificando ainda mais o seu uso.

O uso da PIVE permite maior número de descendentes por vaca ao longo de sua vida (PONTES et al., 2009), ainda havendo otimização do uso do sêmen, pois é necessário um menor número de espermatozoides para produção de embriões (LACERDA et al., 2020), aumentando-se as chances de obtenção de indivíduos do sexo desejado. Contudo, mesmo com o avanço da técnica, a qualidade dos embriões produzidos permanece como um dos grandes desafios encontrados na PIVE. Observam-se maior proporção de anormalidades cromossômicas, bem como menor número de células e expressão gênica anormal em embriões produzidos *in vitro*, levando à produção de bezerros de menor viabilidade (HANSEN, 2020).

A produção e qualidade dos embriões produzidos estão sujeitas a limitações inerentes à técnica, como a redução da qualidade oocitária após a maturação *in vitro* (MIV). A MIV é uma fase determinante para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Ademais, o uso de sêmen sexado pode influenciar na produção de embriões (DEJARNETTE et al., 2011), e, embriões produzidos *in vitro* também são menos tolerantes aos processos de congelamento (RIZOS et al., 2008). Sobretudo, fatores como a habilidade dos técnicos que realizam a aspiração dos oócitos ou *ovum pick-up* (OPU) e os procedimentos laboratoriais podem influenciar os resultados. Estes fatores

em conjunto resultam em menores taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro* quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (EALY; WOOLDRIDGE; MCCOSKI, 2019). Fatores inerentes aos animais, como a raça e o grupamento genético (GG) e a condição corporal da doadora, fertilidade do touro e qualidade do sêmen, tipo de sêmen (sexado ou não), bem como fatores relacionados ao ambiente, como o estresse térmico por calor, também podem influenciar a PIVE.

Alguns autores relataram relação direta entre o número de oócitos totais e viáveis recuperados por sessão de OPU e a média de embriões produzidos (FERES et al., 2018; MONTEIRO et al., 2017). Em outro estudo essa relação não foi observada (WATANABE et al., 2018). Estas diferenças podem ser associadas ao GG da doadora, havendo a necessidade de mais estudos para entender a relação entre o número total de oócitos e de oócitos viáveis recuperados e a conversão em embriões *in vitro*. A hipótese do trabalho é que vacas taurinas produzem menor número de oócitos viáveis e, conseqüentemente, de embriões do que vacas zebuínas e mestiças, especialmente na primavera e no verão, devido aos efeitos do estresse térmico por calor. Além disso, é possível que o GG do touro utilizado na fertilização altere as taxas de clivagem e produção de embriões. Assim, os objetivos deste estudo foram, a partir de dados provenientes de laboratório comercial, verificar o desempenho de doadoras Holandês, Gir e mestiças $\frac{3}{4}$ Holandês x Gir nos resultados da PIVE e avaliar quais são os principais fatores que interferem no sucesso da PIVE, considerando, principalmente, a estação do ano e a contribuição do touro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Principais fatores que determinam o sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos

2.1.1 Fatores relacionados à doadora

2.1.1.1 Grupo genético da doadora

De forma geral, os resultados da PIVE são melhores em animais *Bos taurus indicus* do que em *Bos taurus taurus* (LACERDA et al., 2020). O número e a taxa de formação de blastocistos são maiores em *Bos taurus indicus* (NÁRVAEZ, 2020; SUDANO et al., 2014), o que se deve, principalmente, a algumas particularidades entre as subespécies

no que se refere tanto a fatores metabólicos quanto endócrinos. Primeiramente, as vacas *Bos taurus indicus* têm maior contagem de folículos antrais (CFA) e maior concentração do hormônio antimülleriano (AMH) (BALDRIGHI et al., 2014). O AMH é sintetizado pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais e é um importante biomarcador endócrino para a CFA e reserva ovariana (BARUSELLI et al., 2015). A CFA está intimamente associada ao maior número de oócitos viáveis e de melhor qualidade (BASTOS et al., 2010; SARTORI et al., 2016; SUDANO et al., 2014), e à produção de embriões (MONTEIRO et al., 201). A CFA é, portanto, um importante preditor da eficiência reprodutiva de uma vaca (MOROTTI et al., 2022) e seu uso na seleção de doadoras é altamente recomendado. Apesar da CFA ser de alta repetibilidade dentro do indivíduo (MONTEIRO et al., 2017), esta característica é altamente variável entre as fêmeas, podendo haver variações dentro de um mesmo grupo racial (WATANABE et al., 2018). Como vacas zebuínas têm CFA mais alta do que vacas taurinas, na maioria das vezes a recuperação de oócitos pela OPU ocorre em períodos aleatórios do ciclo estral e sem estimulação com hormônio folículo estimulante (FSH) (SIMMONS et al., 2023). Em contrapartida, o uso da estimulação com FSH e a sincronização da emergência da onda folicular em vacas taurinas tem sido utilizado com intuito de aumentar as taxas de recuperação oocitária por sessão de OPU (BARUSELLI et al., 2021).

As concentrações plasmáticas de insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e colesterol são significativamente maiores em *Bos taurus indicus* (SARTORI et al., 2016). A insulina e o IGF-1 juntos atuam como estimuladores das células da granulosa, que são responsáveis pela produção do estradiol e inibina, importantes no processo de desenvolvimento folicular e ovulação, enquanto o colesterol é um precursor da síntese de hormônios esteroides (SARTORI et al., 2016). Já as fêmeas *Bos taurus taurus* apresentam outras particularidades que implicam em menores taxas de sucesso na conversão de embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Essas vacas ovulam seus folículos com diâmetro maior (BASTOS et al., 2010), formam corpos lúteos (CL) maiores (BALDRIGHI et al., 2015), e, apesar disso, as concentrações de progesterona (P4) e de estradiol na corrente sanguínea são baixas (SARTORI et al., 2016). A isto, se associam a alta metabolização hepática de hormônios esteroides nas vacas de alta produção de leite, principalmente Holandês, e ou a menor produção de esteroides pelos próprios folículos e CL (WATHES et al., 2003). Devido às diferenças entre vacas

taurinas e zebuínas, o seu cruzamento pode trazer benefícios no desempenho reprodutivo de doadoras. Segundo Lacerda et al. (2020), a média de oócitos e embriões viáveis por sessão de OPU de doadoras $\frac{1}{2}$ Holandês x $\frac{1}{2}$ Gir é maior em relação às doadoras Holandês e Gir separadamente. Resultados semelhantes também foram relatados por Pontes et al. (2010). Em vacas Gir, há maior abundância de proteínas plasmáticas associadas à gestação e à competência oocitária do que em taurinas (LOPES et al., 2017), o que implica em melhor desempenho na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário.

2.1.1.2 Idade da doadora

A idade da doadora também é uma característica importante a ser considerada. Existem diferenças evidentes quanto ao tamanho, metabolismo, síntese de proteínas e competência citoplasmática de oócitos de bezerras pré-púberes e fêmeas adultas (SALAMONE et al., 2001). Fêmeas pré-púberes têm oócitos de menor qualidade e taxa média de blastocistos menor (REVEL et al., 1995). Como a competência oocitária está intimamente relacionada com o tamanho folicular e o estado hormonal da fêmea (LOONERGAN et al., 1994), folículos menores e a baixa concentração de hormônios reprodutivos nas fêmeas pré-púberes podem culminar em menor rendimento na PIVE. O desenvolvimento inicial de embriões de fêmeas pré-púberes também é complexo; há maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de glutathiona, e aumento da expressão de DNA mitocondrial, indicando estresse oxidativo mais acentuado, que acarreta efeitos deletérios aos oócitos e embriões dessas fêmeas (MIZUNOE et al., 2018; SAKATANI; KOBAYASHI; TAKAHASHI, 2004; TRAUT et al., 2022).

Por outro lado, algumas diferenças também podem ser observadas quando se compara apenas vacas adultas de meia idade (4-6 anos) e vacas velhas (> 9 anos), como menor número de folículos ovarianos responsivos a gonadotrofinas exógenas, menor recuperação oocitária (NARANJO-CHACÓN et al., 2019), menor taxa de ovulação e menor número e qualidade dos embriões produzidos (ALVAREZ et al., 2018; LANDRY et al., 2016) em vacas mais velhas (> 9 anos). Estas diferenças na fertilidade de vacas mais velhas estão intimamente associadas ao esgotamento do número de oócitos da reserva folicular e a distúrbios endócrinos (ALVAREZ et al., 2018), afetando assim a qualidade oocitária e a subsequente fertilização. Contudo, a fertilização *in vitro* de oócitos de vacas a partir de nove anos de idade é possível de ocorrer, e apesar destas particularidades, alguns autores ainda relatam que pode haver melhora dos resultados

reprodutivos quando estas fêmeas são submetidas a protocolos de sincronização da ovulação (ALVAREZ et al., 2018; VIEIRA et al., 2014).

2.1.1.3 Qualidade dos oócitos produzidos pela doadora

A qualidade oocitária é definida pela capacidade dos oócitos de se desenvolverem até um embrião com potencial de implantação (RIENZI et al., 2012), sendo o principal fator que influencia na taxa de produção de blastocistos (LONERGAN et al., 2016). Diversos são os fatores que podem influenciar na qualidade oocitária nos bovinos, como as condições de manejo e de produção do gado (LYNC; MACMILLAN, 1996), a dieta (FOULADI-NASHTA et al., 2007), o estado nutricional (TORRES et al., 2015), situações de estresse metabólico, como cetose, balanço energético negativo e hipocalcemia (GU, LING et al., 2015), doenças (DICKSON et al., 2020), idade do oócito (MIAO et al., 2009), fase do ciclo estral e o *status* hormonal da doadora (MACHATKOVÁ et al., 1996) e a estação do ano (LOPEZ GATIUS; HUNTER, 2020).

2.1.1.4 Estado nutricional e metabólico da doadora

O estado nutricional das vacas pode ser determinado pelo peso corporal e o escore de condição corporal (ECC), influenciando diretamente a qualidade oocitária (TORRES et al., 2015). Vacas com ECC 2,5 - 3,5 (escala de 0 a 5 pontos) apresentam maior número de folículos por ovário (BEZDÍCEK et al., 2012), enquanto em vacas em situações de subnutrição o número de folículos em crescimento é menor e a qualidade oocitária é afetada negativamente (TORRES et al., 2015). Por meio de mudanças na dieta é possível induzir alterações de fatores humorais relacionados com as vias de sinalização endócrina e metabólica, as quais são essenciais ao funcionamento dos mecanismos reprodutivos dos ruminantes (SARTORI; SPIES; WILTBANK, 2017; TOMITA et al., 2023), como o desenvolvimento folicular e o desenvolvimento embrionário após a fertilização (ARMSTRONG et al., 2001). Portanto, há uma associação clara entre a nutrição e a fertilidade em fêmeas ruminantes (RABIEE et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Sartori, Spies e Wiltbank (2017) em seu trabalho de revisão, mencionaram que a reprodução pode ser afetada pelos ingredientes da dieta, a ingestão dos alimentos, o número de refeições fornecidas ao dia ou mesmo o período (dias) de fornecimento de cada dieta.

Em vacas e novilhas alimentadas com dietas de alto valor energético, mesmo que por períodos curtos, a foliculogênese é estimulada, há aumento no número de folículos (GONG JG et al., 2002), melhora na qualidade dos oócitos recuperados na OPU

(SALES et al., 2015) e maior concentração de insulina na circulação sanguínea (GARNSWORTHY et al., 2009; TOMITA et al., 2023). Ademais, em relação à taxa de blastocistos, alguns autores relataram efeitos prejudiciais de dietas de alto valor energético (SALES et al., 2015), enquanto outros não observaram este efeito (TOMITA et al., 2020). Contudo, vale ressaltar que o fornecimento de dietas com teor elevado de energia para vacas com ECC moderado a alto leva a efeitos negativos na fertilidade, como relatado por alguns autores (LEIVA et al., 2015; SALES et al., 2015; SARTORI et al., 2016). Assim, os benefícios das dietas de alto valor energético são observados principalmente em fêmeas com ECC baixo e em situações de subnutrição (ADAMIAK et al., 2005). Ademais, os benefícios encontrados na fertilidade de vacas recebendo dietas com alto valor energético variam de acordo com o estado metabólico da fêmea, com melhores resultados em *Bos taurus taurus* e, principalmente, nas vacas de alta produção de leite (SALES et al., 2015).

O tipo de alimento concentrado fornecido, bem como a proporção forragem x concentrado na alimentação de ruminantes, também podem influenciar na reprodução (REED et al., 1997; SARTORI; SPIES; WILTBANK, 2017; SPIEKERS et al., 1991), visto que a proporção entre os tipos de ácidos graxos produzidos no rúmen pode diferir de acordo com a dieta fornecida, levando a alterações metabólicas e nos hormônios circulantes (SMITH et al., 2006). De acordo com um estudo realizado por Yaakub, Callaghan e Boland (1999), novilhas *Bos taurus taurus* alimentadas com polpa cítrica e polpa de beterraba produziram embriões de melhor qualidade e maior número de embriões transferíveis, em comparação a novilhas alimentadas com o concentrado de cevada. Reed et al. (1997) avaliaram o uso da cevada como fonte de concentrado na dieta de ruminantes na proporção de 50:50 (concentrado x forragem) e não perceberam alterações na produção de propionato no rúmen, contudo, a concentração sérica de insulina aumentou e nenhum efeito na reprodução foi observado.

Em contrapartida, quando utiliza-se alimentos ricos em gordura como fonte de energia na dieta, diferenças nos tipos de ácidos graxos saturados presentes no fluido folicular são observadas (AARDEMA et al., 2013). Altas concentrações de ácidos graxos saturados no fluido folicular levam a baixa qualidade dos complexos *cummulus oophorus* (COCs) e baixo desenvolvimento subsequente *in vitro* (AARDEMA et al., 2013), enquanto altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados melhoram a qualidade dos COCs, ajudam no processo de formação do CL e aumentam a

disponibilidade de precursores de hormônios esteroides e de prostaglandinas (ROCHE., 2006). Ademais, a suplementação na dieta de ruminantes com alimentos ricos em ácido linoleico aumenta as concentrações circulantes de P4 e de colesterol (CORDEIRO et al., 2015) e ocasiona efeitos positivos na qualidade embrionária (CERRI et al., 2009; LOPES et al., 2009).

A qualidade oocitária também pode ser prejudicada em vacas no início da lactação (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010), devido às alterações metabólicas que ocorrem comumente neste período, como o balanço energético negativo resultante da alta demanda nutricional para produção de leite relativa à ingestão de alimentos (POIRIER et al., 2020). Neste período há grande mobilização de gordura corporal para a produção de leite e mudanças na biossíntese de hormônios (ROTH et al., 2018), maior concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e corpos cetônicos no sangue, assim como maior ocorrência das endometrites (OSPINA et al., 2010). Devido a estas alterações, a composição do fluido folicular pode ser alterada (POIRIER et al., 2020), apresentando maiores concentrações de AGNE (LEROY et al., 2004), ureia e colesterol total (VANHOLDER et al., 2005), bem como de corpos cetônicos (OPSONA et al., 2010). Alterações na composição do fluido folicular são relevantes para a capacidade de desenvolvimento do oócito, que podem influenciar as taxas de maturação, fertilização e formação de blastocistos (LEROY et al., 2004).

2.1.1.5 Fase do ciclo estral e status hormonal da doadora

Em bovinos, o desenvolvimento folicular ocorre por meio de ondas de crescimento folicular (BAIRD, 1987), em ciclos de 21 dias, podendo variar de 2-4 ondas por ciclo estral (SAVIO; BOLAND; ROCHE, 1990). Em cada onda, folículos são recrutados ao crescimento, sendo que um torna-se dominante e inibe o crescimento dos demais pelo aumento de estrógeno e inibina (FORTUNE, 1994), levando à regressão e atresia dos folículos subordinados. Sobretudo, na última onda folicular de cada ciclo estral, ou seja, durante a onda ovulatória, a produção de estrógeno pelo folículo dominante acarreta no pico de liberação de hormônio luteinizante (LH), que é essencial para ocorrência da ovulação, luteinização das células da granulosa e formação do CL. Portanto, sabe-se que, mesmo em vacas saudáveis e com bom manejo nutricional, a fase do ciclo estral e as estruturas presentes no ovário no momento da OPU podem influenciar a qualidade oocitária (SIRARD; BLONDIN, 1996).

A presença de um folículo dominante (FD) no dia da OPU pode suprimir o crescimento dos folículos subordinados, resultando em atresia e oócitos de baixa qualidade (NEGLIA et al., 2011), menores taxas de blastocisto na PIVE, blastocistos com menor número total de células e com maior proporção de células apoptóticas (AZARI-DOLATABAD et al., 2023). Desta forma, é necessário que haja o equilíbrio entre as concentrações hormonais (relação E2 e P4) para que o oócito tenha competência de desenvolvimento e maturação final (AARDEMA et al., 2013). Contudo, alguns autores não relataram efeitos negativos da presença do FD na competência oocitária (SMITH et al., 1996).

No caso do CL, alguns estudos relatam a sua relação com a contribuição na qualidade do oócito coletado (AZARI-DOLATABAD et al., 2022; HAJARIAN et al., 2016; SUGULLE; DOCHI; KOYAMA, 2008). O CL é uma estrutura formada no ovário por meio da luteinização das células da granulosa remanescentes do folículo recém-ovulado e é responsável pela síntese e secreção da P4, hormônio essencial no estabelecimento e manutenção da gestação (SARTORI et al., 2006). Concentrações aumentadas de P4 na circulação sanguínea durante o período de desenvolvimento de folículos antrais são geralmente associadas à melhora na qualidade oocitária, possivelmente pela supressão dos pulsos LH e encurtamento das ondas foliculares, o que acaba por evitar o envelhecimento do oócitos (FAIR; LONERGAN, 2012; WILTBANK et al., 2011). Ademais, outros autores descreveram tanto efeitos positivos (BOEDIONO et al., 1995; SAAD et al., 2019) quanto negativos (QUEZADA-CASASOLA et al., 2020) da presença de CL; contudo, estes estudos foram realizados com ovários obtidos de abatedouro, com pouco ou nenhum conhecimento do histórico das doadoras.

A presença de um CL no momento da coleta de oócitos está associado a melhora na qualidade oocitária e na competência de desenvolvimento *in vitro* em vacas *Bos taurus taurus* (RIZOS et al., 2008) e *Bos taurus indicus* (SAAD et al., 2019). Da mesma forma, SIMMONS et al. (2023) relataram que a presença de um CL ativo no dia da OPU, com a associação ou não de estimulação com FSH, foi relacionada a benefícios no desenvolvimento embrionário subsequente. Concentrações maiores de P4 no fluido folicular foram observadas em folículos próximos ao CL ativo comparadas às de folículos no ovário contralateral (ARGUDO et al., 2020; AZARI-DOLATABAD et al.,

2023; BOEDIONO et al., 1995), implicando em oócitos de melhor qualidade e capacidade de desenvolvimento embrionário subsequente (ARGUDO et al., 2020).

2.1.2 Fatores ambientais

2.1.3.1 Estresse térmico

O estresse térmico é uma resposta fisiológica e comportamental resultante das condições internas (estado metabólico) e externas (ambientais), como a temperatura e umidade relativa do ar, radiação solar, pressão atmosférica e velocidade do vento (ARIAS; MADER.; ESCOBAR, 2008). No estresse térmico por calor, tais fatores atuam no animal levando a alterações da temperatura corporal, que excede os limites fisiológicos devido a uma deficiência dos mecanismos de sudorese, fluxo sanguíneo e de frequência respiratória (ABDELATTY et al., 2018) de regular a temperatura, e manter a normotermia (MORREL, 2020). Os efeitos deletérios do estresse térmico por calor na reprodução dos bovinos vão depender muito da resposta individual (KHAN et al., 2020), todavia, observam-se, frequentemente, alterações na manifestação do cio (HUBER et al., 2020), inflamação uterina (BECKER; COLLIER; STONE, 2020), diminuição da taxa de prenhez (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000), aumento de perda embrionária precoce (SAKATANI, 2017), abortos (BECKER; COLLIER; STONE, 2020) e diminuição do peso fetal e placentário (SUCCU et al., 2020), danos ao sistema imunológico (HUBER et al., 2020) e efeitos negativos na reserva ovariana da progênie (AKBARINEJAD; CHARAGOZLOU; VOJGANI, 2017).

As condições climáticas influenciam diretamente o sucesso da PIVE e o desenvolvimento embrionário, pela sensibilidade dos oócitos às altas temperaturas (MACEDO et al., 2014). Na etapa de maturação, o oócito é altamente sensível às oscilações de temperatura (MOURA; LOPES, 2020). Em situações de estresse térmico induzido *in vitro*, por exemplo, há ativação tardia da resposta transcricional e comprometimento da maturação oocitária (SHEN et al., 2010), além de maior porcentagem de apoptose, bloqueio da meiose I para meiose II (ROTH; HANSEN, 2005) e menos embriões conseguem chegar até o estágio de blastocisto (GENDELMAN et al., 2010). Ademais, em condições de cultivo *in vitro*, o estresse térmico pode ocorrer durante os processos de manipulação dos oócitos, zigotos e embriões, provocando alterações em microtúbulos e microfilamentos (RIVERA et al., 2004) e aumento na produção de EROS (SAKANANI et al., 2004), comprometendo a funcionalidade dos

oócitos (CAVALHARI et al., 2019) e levando a despolarização da célula devido ao aumento no número de mitocôndrias lesadas (FORTUNE et al., 2004). Todavia, componentes como os fatores de crescimento no meio MIV podem melhorar as taxas de produção e a sobrevivência do embrião, por reduzir a taxa de apoptose (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009). A IGF-1 é bastante utilizada nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos e seu uso na forma isolada ou combinada durante a MIV leva à expansão de células do COCs (SATRAPA et al., 2013), e por consequência, há aumento da síntese de esteroides nas células da granulosa e da teca, além de redução das taxas de apoptose oocitária (WASIELAK; BOGACKI, 2007), aumentando consequentemente a termotolerância do embrião (MEIYU; LIU; ROTH, 2015).

Vacas *Bos taurus taurus* são mais sensíveis ao estresse térmico por calor (BERMAN et al., 1985) quando comparadas a vacas *Bos taurus indicus*, devido a sua menor capacidade de dissipação de calor para o ambiente (LOPES et al., 2012). Associado a isto, a alta taxa metabólica de vacas de alta produção (LOPES et al., 2014) também gera muito calor, tornando as vacas holandesas as mais susceptíveis ao estresse térmico por calor (FERREIRA et al., 2011). No verão, menores recuperação oocitária e produção de embriões em vacas *Bos taurus taurus* foram observadas (FERNANDES et al., 2014) e a qualidade do embrião também foi afetada negativamente (SILVA et al., 2013). Em vacas *Bos taurus indicus* destinadas à produção de leite, os efeitos do estresse térmico por calor são menos acentuados devido às suas origens e aptidão produtiva, no entanto, a possibilidade de ocorrência de efeitos deletérios não deve ser excluída (AMNDSON et al., 2006).

Em vacas leiteiras de alta produção, há comprometimento na produção e liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e na concentração sanguínea dos hormônios FSH e LH (MEYU et al., 2017). Assim, a seleção e o desenvolvimento dos folículos ovarianos são prejudicados, desde os folículos primordiais até os pré-antrais (FAIR., 2003). Há prejuízos também na ovulação, formação do CL e na qualidade oocitária (LOPEZ GATIUS; HNTER, 2020; RAHMAN et al., 2018), influenciando a competência de desenvolvimento, maturação oocitária e demais fases da PIVE. Os efeitos prejudiciais advindos de deficiências de hormônios do sistema nervoso central podem se prolongar por até 60 dias, mesmo após a amenização da temperatura (BANDIGA et al., 1985). Efeitos residuais de natureza endócrina podem se prolongar até mesmo nos períodos de outono e inverno, dependendo da magnitude do estresse

térmico sofrido (WONLFESON et al., 2000), resultando em quedas nas taxas de blastocisto por até 105 dias após o estresse (TORRES et al., 2008). A baixa fertilidade no verão também pode ser explicada por alterações nos perfis bioquímicos (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010) e aumento de ácidos graxos saturados não esterificados nas células da granulosa e no oócito (VANHOLDER et al., 2005). Tais mudanças alteram a permeabilidade da membrana e inibem a sobrevivência e a proliferação das células da granulosa (VANHOLDER et al., 2005), acarretando em prejuízos no número de oócitos recuperados (KATANANI et al., 2002), na qualidade e desenvolvimento oocitário (BERTOLDO et al., 2010).

Considerando-se que o estresse térmico pode ocorrer pela junção de fatores ambientais, raciais e metabólicos, o cruzamento entre raças taurinas e raças mais adaptadas a climas quentes e de maior produção leiteira e a identificação de genes de termotolerância também podem ser opções para minimizar estes efeitos (HANSEN., 2004; HASSAN et al., 2019), bem como o uso de antioxidantes na alimentação ou nos meios de cultivo (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010). Sobretudo, oócitos e embriões provenientes de doadoras zebuínas são mais resistentes ao estresse térmico por calor, que pode ocorrer em fêmeas a depender do manejo da fazenda, das instalações, dos fatores climáticos e estado metabólico (EBERHARDT et al., 2009; LOPES et al., 2003), tópico que será melhor abordado posteriormente.

2.1.3 Fatores relacionados a técnica

2.1.3.1 *Ovum-pick up* e intervalos entre a sessões

O intervalo das sessões de OPU também pode influenciar a qualidade dos oócitos (NOLAN et al., 1998). A qualidade e a taxa de maturação oocitária são melhores quando a coleta de oócitos é realizada no intervalo de 3 a 4 dias, comparado a sessões realizadas em intervalos de 7 dias (MERTON et al., 2003; NAWAZ et al., 2022). Todavia, sessões realizadas a cada 14 dias também trazem bons resultados, principalmente, quando realizadas em associação com a sincronização da onda folicular (BLONDIN et al., 2012), visto que a população folicular é aumentada e a taxa de recuperação oocitária é melhorada (FERRAZ et al., 2015), bem como o número de folículos de tamanho médio é maior (KONRAD et al., 2017) e a taxa de maturação oocitária é melhor (NAWAZ et al., 2022). Apesar de os estudos demonstrarem aumento na taxa de maturação e na

qualidade oocitária nos intervalos de OPU de 3-4 dias e de 14 dias, as taxas de clivagem e de formação de blastocistos permanecem inalteradas quando comparadas àquelas de OPU com intervalo de 7 dias (NAWAZ et al., 2022; PETYIM et al., 2003).

O momento ideal de realização da OPU está associado ao tamanho do folículo e ao *status* de diferenciação folicular (SIRARD et al., 2018). O tamanho ideal dos folículos para realização da OPU é de 7-8 mm, quando estão em uma fase do desenvolvimento caracterizada por condições adequadas para o processo final de maturação (LUCIANO; SIRARD., 2018), resultando em melhores taxas de fertilização (VIEIRA et al., 2014) e produção de embriões viáveis (SENEDA et al., 2020). A frequência ideal de aspiração dos folículos depende de fatores como GG, idade da doadora, condição fisiológica e metabólica, balanço energético, CFA, histórico reprodutivo, sincronização da onda folicular e histórico de desempenho na superestimulação com FSH. Contudo, é importante salientar que sessões frequentes de OPU em uma mesma doadora podem ocasionar danos ao estroma ovariano devido às lesões comumente causadas nos vasos sanguíneos (BACKER et al., 1996), podendo levar a aderências ovarianas e comprometer o tempo de vida útil do ovário e a vida reprodutiva da fêmea doadora (VIANA et al., 2003).

Por fim, o número e a qualidade dos oócitos recuperados por sessão de OPU podem ser influenciados pelo técnico que realiza a aspiração folicular (MERTON et al., 2003), a pressão de vácuo na bomba e o diâmetro da agulha utilizadas na aspiração (LOPES et al., 2006; MERTON et al., 2003), bisel e calibre da agulha (SASAMOTO et al., 2003; SOOM et al., 1997). O tipo de ultrassom usado também interfere na quantidade de COCs recuperados, pois aparelhos que permitem maior nitidez de imagem, permitem a visualização de mais folículos (SOOM; STOUT., 2018).

2.1.3.2 Estresse oxidativo

De forma geral, o metabolismo oxidativo desempenha papel fundamental no fornecimento de energia para os processos metabólicos das células e é de grande importância nos processos de maturação oocitária e desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto (PANDEY et al., 2017). Cerca de 95% da adenosina trifosfato (ATP) utilizado neste período é gerado pelo metabolismo oxidativo (STRNEY; LEESE., 2003). Todavia, durante este processo de fornecimento de energia, radicais livres são comumente formados como subprodutos, podendo haver formação das EROs e ou a

formação das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SIES et al., 2017). Dentre as EROs, pode haver a formação de três tipos de radicais livres, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que tem alta capacidade de remoção de elétrons de outras moléculas (SIES, 2017), o radical hidroxila - OH (GAVARIC et al., 2015) e o ânion superóxido - O_2^- (ARISTATILE et al., 2015) principalmente, enquanto, entre as RNS formadas, inclui-se principalmente o óxido nítrico - NO (ARISTATILE et al., 2015).

As EROs são moléculas sinalizadoras que auxiliam na retomada da meiose em oócitos (DOWNS; MASTROPOLO, 1994), enquanto as ERNs desempenham papéis sinalizadores importantes na modulação da interação entre o oócito e o espermatozoide e durante o processo de desenvolvimento embrionário inicial (LOREN et al., 2017; PANDEY et al., 2010). Embora o metabolismo oxidativo e a formação de radicais livres desempenhem papéis importantes no mecanismo celular (CAJAS et al., 2020; LOREN et al., 2017; PANDEY et al., 2010), o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade antioxidante das células é crucial para a manutenção da sua viabilidade (HE et al., 2016). O estresse oxidativo ocorre quando há acúmulo de radicais livres no interior da célula, seja pela produção exacerbada de EROS ou pela falta de componentes neutralizantes, e está entre as principais causas de prejuízos à competência de desenvolvimento do oócito (GUPTA; SEKHON; AGARWAL, 2010). Os radicais formados no processo oxidativo têm a capacidade de atravessar membranas celulares e podem inativar proteínas, desintegrar DNA, causar efeitos prejudiciais na atividade mitocondrial, na formação do fuso meiótico e na configuração da cromatina (HE et al., 2016), levando a apoptose celular (GÉRIN; EL MOATASSIM; MENEZO, 2001). Como componentes neutralizantes, as enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase (PANDEY et al., 2010) atuam reduzindo os danos celulares em oócitos bovinos e auxiliam na restauração da atividade mitocondrial, reduzindo a presença de gorduras saturadas, inibindo processos apoptóticos e reestabelecendo a estrutura de membrana das células (GUPTA; SEKHON; AGARWAL, 2010).

No caso da PIVE, os meios de cultivo podem ser uma importante fonte de EROS (SÁ, NAIZA AR et al., 2020), assim como o contato com o sêmen de menor qualidade, o ambiente inadequado da estufa, a concentração inadequada de gases e o contato com a luz (estresse fotodinâmico). Em geral, todos os processos que envolvem a manipulação dos oócitos podem influenciar nos resultados da PIVE (ARGAWAL et al., 2006;

MARTÍN- ROMERO ET AL., 2008), principalmente quando não conduzidos da forma adequada.

2.1.4 Fatores relacionados ao touro

2.1.4.1 Touro

O sêmen de touros utilizados na PIVE normalmente é criopreservado e proveniente de grandes centrais de inseminação artificial. No entanto, o potencial de fertilização do sêmen dos touros utilizados é altamente variável, influenciando diretamente nos resultados da PIVE (ADONA et al., 2022). Outro ponto importante a ser considerado é que a capacitação espermática, que normalmente ocorre no trato reprodutivo das fêmeas em situações naturais, deve ser mimetizada em situações *in vitro* com o uso de aditivos nos meios de fertilização. É essencial, portanto, a qualidade dos meios de fertilização utilizados na capacitação dos espermatozoides para o sucesso no processo de fertilização (JIN; YANG, 2017). Existem muitas variações nas taxas de fertilidade *in vivo e in vitro* entre touros relacionadas a diferenças na qualidade do sêmen (WATANABE et al., 2017), ligadas ao perfil de expressão gênica (GOVINDARAJU et al., 2012) e à composição proteica do plasma seminal (GAVIRAGHI et al., 2010). A predição da fertilidade de touros consiste na avaliação de motilidade e morfologia dos espermatozoides (KHALIL et al., 2019), concentração espermática, análise morfofuncional por sondas fluorescentes, citometria de fluxo, testes de incubação e separação de espermatozoides (ARRUDA et al., 2015; KHALIL et al., 2019; RODRIGUEZ, 2007), bem como, na avaliação da taxas de prenhez e de blastocistos (ADONA et al., 2022).

Outro ponto importante que deve ser levado em consideração sobre a contribuição do sêmen no sucesso da PIVE é que o número de espermatozoides por ejaculado e a motilidade espermática podem ser afetados pela idade do touro (BRITO ET AL., 2002), época de coleta do sêmen (MALAMA ET AL., 2017) e o intervalo (dias) entre as coletas de sêmen (EVERETT; BEAN., 1982). Portanto, as condições espermáticas dos touros em momentos específicos podem estar associadas a efeitos negativos na fertilização (ANIFANDES et al., 2014), afetando as taxas de clivagem (WARD et al., 2001) e de blastocistos (ADONA et al., 2022; FERES et al., 2018), além de poder influenciar no desenvolvimento embrionário inicial (CASTRO et al., 2016). Ademais, variações

também podem ocorrer por diferentes partidas de sêmen e palhetas de um mesmo touro (ADONA et al., 2022).

2.4.1.2 Tipo de Sêmen

Uma das vantagens da utilização da PIVE está relacionada ao uso de sêmen sexado. O sêmen sexado de fêmeas, por exemplo, é bastante vantajoso, principalmente, na pecuária leiteira, minimizando os custos de recria e maximizando o retorno financeiro. Entretanto, o uso de sêmen sexado pode influenciar nos resultados de produção *in vitro*, principalmente pela menor motilidade e danos que podem ocorrer com os espermatozoides no processo de triagem (XU, J. et al., 2006). A fertilidade do sêmen de touros é menor *in vivo* e *in vitro* quando passam por um processo de triagem e separação por sexo (DEJARNETTE et al., 2011).

Estes desafios relacionados à menor eficiência na PIVE podem ser atribuídos a maiores alterações encontradas em espermatozoides que passam pelo processo de triagem, como alterações de acrossoma, membrana plasmática (CARVALHO et al., 2010; MOCE et al., 2006), mitocôndrias e na expressão gênica (PALMA., 2007; RATH et al., 2013). Também já foi identificada menor abundância de proteínas que participam dos processos de capacitação e fusão de gametas em espermatozoides separados por sexo (MOSTEK et al., 2020) e redução da taxa de clivagem em até 39% (TRAVNICKOVA et al., 2021), e por consequência, a formação de blastocistos também é afetada (BERJEMO-ALVAREZ et al., 2010). O uso do sêmen separado por sexo na PIVE pode resultar em embriões com maiores anormalidades cromossômicas, crescimento embrionário inicial mais lento e menor sobrevivência após processos de congelamento e descongelamento (MAGATA et al., 2021).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores que podem interferir na produção de embriões em bovinos são vastos. É importante se atentar não somente na escolha da doadora e do touro utilizado, mas também ao manejo nutricional adequado e ao conforto térmico destes animais. Sobretudo, é crucial conduzir de maneira criteriosa todas as etapas da PIVE para minimizar possíveis fatores estressores, desde o momento da OPU até as etapas laboratoriais. Nesse contexto, um estudo atualizado e sistemático sobre o desempenho de diferentes raças de doadoras e touros utilizados na PIVE se torna necessário,

juntamente com a identificação de como os fatores ambientais e laboratoriais podem afetar a produção de embriões.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, BERNARD A.J.; ROELEN, HELENA T.A.; VAN TOL, CHRITINE H.Y; OEI, BART M; GADELLA, PETER L.A.M. VOS. **Follicular 17 β -estradiol and progesterone concentrations and degree of cumulus cell expansion as predictors of in vivo-matured oocyte developmental competence in superstimulated heifers.** *Theriogenology*, Volume 80, Issue 6, 2013, Pages 576-583.
- ABDELATTY, ALZAHRAA M.; IWANIUK, M.E.; POTTS, S.B.; GARD, A. **Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine oocyte and embryo development.** *International Journal of Veterinary Science and medicine*, v. 6, p. S1-S5, 2018.
- ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. **Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle.** *Biology Reproduction*. 73, 918–926, 2005.
- ADONA, P. R.; SOUZA, Y. L.; SANTOS MIRANDA, M.; RODRIGUES, I.; GUEMRA, S.; FERREIRA, M. B. **Fertility analysis of bovine semen by in vitro fertilization.** *Tropical Animal Health and Production*, 54(2), 137, 2022.
- AKBARINEJAD, V.; GHARAGOZLOU, F.; VOJGANI, M. **Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine.** *Theriogenology*, v. 99, p. 69-78, 2017.
- ARGUDO, D. E.; TENEMAZA, M. A.; MERCHÁN, S. L.; BALVOA, J. A.; MÉNDEZ, M. S.; SORIA, M. E.; PEREA, F. P. **Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance.** *Theriogenology*, 155, 232-239, 2020.
- ARIAS, R. A.; MADER, T. L.; ESCOBAR, P. C. **Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche.** *Archivos de medicina veterinaria*, v. 40, n. 1, p. 7-22, 2008.
- ARMSTRONG D.G.; MCEYOY T.G.; BAXTER G.; ROBINSON J.J.; HOGG C.O.; WOAD K.J.; WEBB R.; SINCALIR K.D. **Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system.** *Biology Reproduction* 2001; 64: 1624–1632.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. D. C.; LEITE, T. G.; OILVEIRA, L. Z.; RODRIGUES, M. D. P. **Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade.** *Revista brasileira de reprodução animal*, 2015.

- AVAREZ, R.H.; BAYEUX, B.M.; WATANABE, Y.F.; MINGOTI, R.D.; CARVALHO, J.B.P.; BARUSELLI, P.S. **Oocyte quality and in vitro embryo production of aged Nelore cows selected for fertility.** *Reproduction Animal*, 15 (Supl. 1), 1160, 2018.
- AZARI-DOLATABAD, N.; BENEDETTI, C.; VELEZ, D.A.; MONTORO, A.F.; SADEGHI, H.; RESIDIWATI, G.; PASCOTINI, O.B. **Oocyte developmental capacity is influenced by intrinsic ovarian factors in a bovine model for individual embryo production.** *Animal Reproduction Science*, 249, 107185, 2023.
- BACKER, F.; KANITZ, W.; NURNBERG, G.; KURTH, J.; SPITSCHAK, M. **Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments.** *Theriogenology*, 46(6), 999-1007, 1996.
- BAIRD, DAVID T. **A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation.** *Journal of steroid biochemistry*, v. 27, n. 1-3, p. 15-23, 1987.
- BALDRIGHI, J.; SÁ FILHO, M. F. D.; BATISTA, E. D. O. S.; LOPES, R. **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, n. 6, p. 1015-1020, 2014.
- BANDIGA, L.; COLLIER, R.J.; THATCHER, W.W. and WILCOX, C.J. 1985. **Effect of climate and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment.** *Journal Dairy Science.*, 68: 78–85.
- BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. D. O. S.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. H. **Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle.** *Animal Reproduction (AR)*, 12(3), 487-497, 2018.
- BARUSELLI, P. S.; RODRIGUES, C. A.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; MICHAEL, J. D. **Impact of oocyte donor age and breed on in vitro embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review.** *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2), 36-51, 2021.
- BASTOS, M.; MATTOS, M.; MESCHIATTI, M.; SURJUS, R. **Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows.** *Acta Scientiae Veterinariae*, 38, n. Suppl 2, p. 776, 2010.
- BECKER, C. A.; COLLIER, R. J.; STONE, A. E. **Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows.** *Journal of dairy science*, v. 103, n. 8, p. 6751-6770, 2020.
- BERMAN, A.Y.; FOLMAN, M.; KAIM, M.; MAMEN, Z.; HERZ, D.; WOLFENSON, A.; ARIELI, GRABER. **Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate.** *Journal Dairy Science*. 68:1488–1495, 1985.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RATH, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; **Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa.** *Reproduction, Fertility and Development*, 22(2), 426-436, 2010.

BERTOLDO, M., HOLYOAKE, P. K., EVANS, G., GRUPEN, C. G. **Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period.** *Reproduction, Fertility and Development*, 22(8), 1222-1229, 2010.

BEZDÍČEK, J., NESVADBOVÁ, A., MAKAVERICH, A., KUBIVICOVÁ, E. **Relationship between the animal body condition and reproduction: the biotechnological aspects.** *Archives Animal Breeding*, 63(1), 203-209.

BLONDIN, P., VIGNEAULT, C., NIVET, A. L., SIRARD, M. A. **Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far?.** *Animal Reproduction (AR)*, 9(3), 281-289, 2018.

BOEDIONO, A., SAHA, S., SUMANTRI, C., SUZUKI, T., RAJAMAHENDRAN, R. **Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle.** *Theriogenology*, 1(43), 169, 1995.

BRITO, L. F. C., SILVA, A. E. D. F., RODRIGUES, L. H., VIEIRA, F. V., DERAGON, L. A. G., KASTELIC, J. P. **Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos taurus AI bulls in Brazil.** *Animal reproduction science*, 70(3-4), 181-190, 2002.

BROGLIATTI, GM, ADAMS, GP. **Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in prepubertal calves.** *Theriogenology*, 45, p.1163 – 1176, 1996.

CARVALHO, J. O., SARTORI, R., MACHADO, G. M., MOURÃO, G. B., DODE, M. A. N. **Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production.** *Theriogenology*, 74(9), 1521-1530, 2010.

CERRI, R. L. A., JUCHEM, S. O., CHEBEL, R. C., RUTIGLIANO, H. M., BRUNO, R. G. S., GALVÃO, K. N., THATCHER, W. W., SANTOS, J. E. P. **Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows.** *J. Dairy Sci.* 92, 1520–1531., 2009.

CHRENEK P, KUBOVICOV E, OLEXIKOVÁ L, MAKAREVICH AV, TOPORCEROVÁ S, OSTRÓ A. **Effect of body condition and season on yield and quality of in vitro produced bovine embryos.** *Zygote* 2015; 23: 893–899.

CORDEIRO, M. B., PERES, M. S., SOUZA, J. M., GASPAR, P., BARBIERE, F., SÁ FILHO, M. F., MATURANA FILHO, M., Dinardi, R. N., Nogueira, G. P., Mesquita, F. S., Pugliesi, G., Martins, T., Binelli, M., and Membrive, C. M. B. **Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in Bos indicus beef cattle.** *Theriogenology* 83, 1461–1468, 2015.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MCCLEARY, C. R.; MORENO, J. F. **Effects of sex-sorting and sperm dosage on**

conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. Journal of Dairy Science, v. 94. n. 7, p. 3477-3483, 2011.

DICKSON, M.J., PIERSANTI, R. L., RAMIREZ-HERNANDEZ, R., DE OLIVEIRA, E. B., BISHOP, J.V., HANSES, T.R., BROMFIELD, J. J. (2020). **Experimentally induced endometritis impairs the developmental capacity of bovine oocytes.** Biology of Reproduction, v. 103, n. 3, p. 508-520, 2020.

EALY, AIAN D.; WOOLDRIDGE, LYDIA K.; MCCOSKI, SARAH R. BOARD INVITED REVIEW: **Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle.** Journal of animal science, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019.

EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R. L.; TRINCA, L. A. et al. **Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat.** Animal Reproduction Science, 114, n. 1, p. 54-61, 2009/08/01/ 2009.

EVERETT, R. W., BEAN, B. **Environmental influences on semen output.** Journal of Dairy science, 65(7), 1303-1310, 1982.

FAIR, T.; LONERGAN, P. **The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence.** Reproduction in Domestic Animals, v. 47, p. 142-147, 2012.

FERES, L. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; DOS SANTOS, L. L. et al. **Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies.** Animal Reproduction Science, 193, p. 165-170, 2018/06/01/ 2018.

FERRARETTO, L. F., GENCOGLU, H., HACKBART, K. S., NASCIMENTO, A. B., DALHA COSTA, F., BENDER, R. W., GUENTHER, J. N., SHAVER, R. D., WILTBANK, M. C. **Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows.** J. Dairy Sci. 97, 754–763, 2014.

FERRAZ, M.L., FILHO M.F.S., BATISTA E.O.S., WATANABE Y.F., WATANABE M.R., DAYAN A., JOAQUIM D.C. **"Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and in vitro embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up."** Animal reproduction science 154 (2015): 1-7.

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STROBECH, L. B.; HYTTEL, P. et al. **Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods.** Animal, 14, n. 5, p. 991-1004, 2020/01/01/ 2020.

FERREIRA, R. M., AYRES, H., CHIARATTI, M. R., FERRAZ, M. L., ARAÚJO, A. B., RODRIGUES, C. A., BARUSELLI, P. S. **The low fertility of repeat-breeder**

cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2383-2392, 2011.

FORTUNE, J. E. **Ovarian follicular growth and development in mammals.** *Biology of Reproduction*, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., YANG, M. Y. **Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle.** *Animal reproduction science*, 82, 109-126, 2004.

FOULADI-NASHTA, A.A., GUTIERREZ, C.G., GONG, J.G., GARNSWORTHY, P.C., WEBB, R. (2007). **Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows.** *Biology of reproduction*, v. 77, n. 1, p. 9-17, 2007.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. **Bovine embryo technologies.** *Theriogenology*, 59, p. 599 – 616, 2003.

GARNSWORTHY PC, FOULADI-NASHTA AA, MANN GE, SINCLAIR KD, WEBB R. **Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows.** *Reproduction*. 137: 759–768, 2009.

GAVIRAGHI, A., DERIU, F., SOGGIU, A., GALLI, A., BONACINA, C., BONIZZI, L., RONCADA, P. **Proteomics to investigate fertility in bulls.** *Veterinary Research Communications*, 34, 33-36, 2010.

GENDELMAN, M., AROYO, A., YAVIN, S., ROTH, Z. **Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos.** *Reproduction*, 140(1), 73-82, 2010.

GONG JG, ARMSTROG DG, BAXTER G, HOGG CO, GARNSWORTHY PC, WEBB R. **The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers.** *Theriogenology* 2002; 57: 1591–1602.

GOVINDARAJ, A., UZUN, A., ROBERTSON, L., ATLI, M. O., KAYA, A., TOPPER, E., MEMILI, E. **Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-10, 2012.

GOVINDARAJU, A., UZUN, A., ROBERTSON, L., ATLI, M. O., KAYA, A., TOPPER, E., MEMILI, E. **Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-10, 2012.

GU, L., LIU, H., GU, X., BOOTS, C., MOLEY, K.H., WANG, Q. **Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes.** *Cellular and molecular life sciences*, v. 72, p. 251-271, 2015.

HAJARIAN, H., SHAHSAVARI, M. H., KARAMI-SHABANKAREH, H., DASHTIZAD, M. **The presence of corpus luteum may have a negative impact on**

in vitro developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, 16(1), 47-52, 2016.

HANSEN, P.J. **Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress.** *Animal reproduction science*, 82, 349-360, 2004.

HANSEN, P.J. **Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals.** *Annual Review of Animal Biosciences*, 8, p.395-413, 2020.

HE, C., WANG, J., ZHANG, Z., YANG, M., LI, Y., TIAN, X., LIU, G. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 939, 2016.

HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. *Australian veterinary journal*, v. 88, n. 8, p. 307-310, 2010.

HENRY J. LESSE. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays/ Volume 24, Issue 9/ p. 854-849.*

HUBER, E., NOTARO, U.S., RECCE, S., RODRIGUEZ, F.M., ORTEGA, H. H., SAVETTI, N. R., REY.F. **Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions.** *Animal reproduction science*, v. 216, p. 106348, 2020.

IRELAND, J. J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J. L. H., SMITH, G. W., LONERGAN, P., EVANS, A. C. O. **Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle.** *Human Reproduction*, 22(6), 1687-1695, 2007.

JEREZ, E. R. M., GARCÍA, A. A., CACCIA, M., RODRIGUÉZ, A. C., GONZALES, S. J. R., WALTERO, E. M. M., MARÍN, D. F. D. **Effect of the presence and location of corpus luteum on competence of bovine cumulus-oocyte complexes.** *Animal Reproduction*, 19, 2022.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. **Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle.** *Biology of reproduction*, v. 80, n. 6, p. 1272-1281, 2009.

JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J. K., IRELAND, J. L. H., SMITH, G. W., HOU, X., DAVIS, J. S., IRELAND, J. J. **Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle.** *Biology of reproduction*, 80(6), 1272-1281, 2009.

JOHNSON, L. A. **Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review.** *Reproduction, Fertility and Development*, 7, n. 4, p. 893-903, 1995.

KASINATHAN, P., WEI, H., XIANG, T., MOLINA, JA, METZGER, J., BROEK, D., KASINATHAN, S., FABER, DC E ALLAN, MF. **Acceleration of genetic gain in cattle by reducing the generation interval.** Scientific Reports, 5, p. 1-4, 2015.

KHALIL, W. A., EL-HARAIRY, M. A., ZEIDAN, A. E., HASSAN, M. A. **Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation.** Theriogenology, 126, 121-127, 2019.

KHAN, A., KHAN, M.Z., UMER, S., KHAN, I.M., XU, H., WANG, Y. **Cellular and molecular adaptation of bovine granulosa cells and oocytes under heat stress.** Animals, v. 10, n. 1, p. 110, 2020.

KONRAD, J., G. CLÉRICO, Garrido M.J., G. TAMINELLI, M. YUPONI, R. YUPONI, G. CRUDELI, M. SANSINENA. **"Ovum pick-up interval in buffalo (Bubalus bubalis) managed under wetland conditions in Argentina: Effect on follicular population, oocyte recovery, and in vitro embryo development."** Animal reproduction science 183, 39-45, 2017.

KUBOVICOVÁ, E., MAKAREVIC, A. V., HEGEDUSOVÁ, Z., SLEZAKOVÁ, M., BEZDICEK, J. (2012). **Effect of body condition score on oocyte yield and in vitro embryo development.** Výzkum v Chovu Skotu, 54(1), 17-22.

LACERDA, I. P., DODE, M. A. N., LIMA, M. M. S., GUERRA, B. F., COSTA, E. S., MOREIRA, G. R., OLIEVEIRA CARVALHO, J. **Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms.** Livestock Science, 240, 104135, 2020.

LANDRY, DA BELLEFLEUR, AM, LABRECQUE, R., GRAND, FX, VIGNEAULT, C., BLONDIN, P., SIRARD, MA. **Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments.** Theriogenology, 86(5), 1240-1246, 2016.

LEIVA, T., COOKE, R. F., BRANDÃO, A. P., ABOIN, A. C., RANCHES, J., VASCONCELOS, J. L. M. **Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows.** Livest. Sci. 180, 121–128, 2015.

LEROY, J. L. M. R., VANHOLDER, T., DELANGHE, J. R., OPSOMER, G., VAN SOOM, A., BOLS, P. E. J., KRUIF, A. **Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum.** Theriogenology, 62(6), 1131-1143, 2004.

LONERGAN, P., FAIR, T., FORDE, N., RIZOS, D. **Embryo development in dairy cattle.** Theriogenology, 86(1), 270-277. 2016.

LONERGAN., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M. P., GORDON, I. **Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro.** Molecular reproduction and development, 37(1), 48-53, 1994.

- LOONEY, C. R., LINDSEY, B. R., GONSETH, C. L., JOHNSON, D. L. **Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization IVF) for embryo production in problem cows.** *Theriogenology*, 41(1), 67-72, 1994.
- LOPES, AC, PALHÃO, MP, FERNANDES, CAC, SUDANO, MJ, CASTILHO, ACS, CAIXETA, ES. **Differential expression of insulin-like growth factor family members in immature cumulus-oocyte complexes from dairy cows with different genotypes.** *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (6), 1067-1073, 2017.
- LOPES, C. N., SCARPA, A. B., CAPPELLOZZA, B. I., COOKE, R. F., VASCONCELOS, J. L. M. **Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows.** *Journal Animal Science*. 87, 3935–3943, 2012. doi:10.2527/JAS, 2009.
- LOPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R. H. F. **Local cooling of the ovary and its implications for heat stress effects on reproduction.** *Theriogenology*, 149, 98-103, 2020.
- LOREN, P., SÁNCHEZ, R., ARIAS, M. E., FELMER, R., RISOPATRÓN, J., CHEUQUEMÁN, C. **Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: impact on gamete handling and in vitro embryo production in humans and other mammals.** *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1119, 2017.
- LUCIANO, A. M., SIRARD, M. A. **Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation.** *Biology of reproduction*, 98(2), 162-169, 2018.
- LYNCH PR, MACMILLAN KL. **Progesterone and a GnRH agonist interact to affect oestrous cycle length and fertility in cattle.** In: *Proc 13th Int Congr Anim Reprod*, Sydney. 3:4–32, 1996.
- M. OZAWA, M. HIRABAYASHI, Y. KANAI. **Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro.** *Society for Reproduction and Fertility Cambridge*, 124 (5), pp. 683 - 689, 2002.
- MACHATKOVA, M., JOKESOVA, E., PETELIKOVA, J., DVORACEK, V. **Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle.** *Theriogenology*, v. 45, n. 4, p. 801-810, 1996.
- MAGATA, F., URAKAWA, M., MaATSUDA, F., OONO, Y. **Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen.** *Theriogenology*, 161, 243-251, 2021.
- MALAMA, E., ZERON, Y., JANETT, F., SIUDA, M., ROTH, Z., BOLWEEIN H. **Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality.** *Theriogenology*, 87, 79-90, 2017.
- MEIYU, QI; LIU, DI; ROTH, ZVI. **IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro.** *Zygote*, v. 23, n. 4, p. 514-524, 2015.

MIAO, Y. L., KIKUCHI, K., SUN, Q. Y., SCHATTEN, H. **Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility.** Human reproduction update, 15(5), 573-585, 2009.

MILENA TRAUT, ILONA KOWALCZYK-ZIEBA, DOROTA BORUSZEWSKA, JOANNA JAWORSKA, KRZYSZTOF LUKASZUK, IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA, **Mitochondrial DNA content and developmental competence of blastocysts derived from pre-pubertal heifer oocytes,** Theriogenology, Volume 191, 2022, Pages 207-220, ISSN 0093-691X.

MIZUNOE, Y., KOBAYASHI, M., SUDO, Y., WATABANABE, S., YASUKAWA, H., NATORI, D., HIGAMI, Y. **A trealose protege contra o estresse oxidativo, regulando as vias Keap1-Nrf2 e autofagia.** Redox biologia, 15, 115-124, 2018.

MOCE, E., GRAHAM, J. K. **Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival.** Journal of Animal Science, 84(4), 826-833, 2006.

MONTEIRO, F. M., BATISTA, E. O. S., VIEIRA, L. M., BAYEUX, B. M., ACCORSI, M., CAMPAHOLI, S. P., BARUSELLI, P. S. **Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions.** Theriogenology, 90, 54-58, 2017.

MORIEL, P., CAPPELLOZZA, B. I., FERRARETTO, L. F., ABOIN, A. C., VIEIRA, F. V. R., RODRIGUES, R. D. O., VASCONCELOS, J. L. M. **Effects of supplementation of calcium salts of polyunsaturated fatty acids on serum concentrations of progesterone and insulin of pregnant dairy cows.** Revista Brasileira de Zootecnia, 43, 20-26, 2014.

MOROTTI, F., MIGUEZ-GONZALEZ, S., CERZETTI, M. B., SENEDA, M. M. **Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the timed artificial insemination in cattle.** Animal Reproduction, 19, 2022.
MORRELL, JANE M. **Heat stress and bull fertility.** Theriogenology, v. 153, p. 62-67, 2020.

MOSS, JAMES I.; PONTES, EDUARDO; HANSEN, PETER JAMES. **Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione.** Archives of toxicology, v. 83, p. 1001-1007, 2009.

MOSTEK, A., JANTA, A., CIERESZKO, A. **Proteomic comparison of non-sexed and sexed (X-bearing) cryopreserved bull semen.** Animal Reproduction Science, 221, 106552, 2020.

MOURA, MARCELO T.; PAULA-LOPES, FABIOLA F. **Thermoprotective molecules to improve oocyte competence under elevated temperature.** Theriogenology, v. 156, p. 262-271, 2020.

NARANJO-CHACÓN, F., MONTIEL-PALACIOS, F., CANSECO-SEDANO, R., AHUJA-AGUIRRE, C. **Embryo production in middle-aged and mature Bos**

taurus × **Bos indicus** cows induced to multiple ovulation in a tropical environment. *Tropical animal health and production*, 51, 2641-2644, 2019.

NARVÁEZ, H. J. **Effect of the genetic group of cows of the Gyr and Holstein breeds on the in vitro production technique of bovine embryos.** *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21, 2020.

NAWAZ, M., SALEEM, M., ULLAH, F., SHABBIR KHAN, G., ZAHOOR, I., AHMAD, N., RIAZ, A. **Exogenous progesterone-dependent modulation in the follicular dynamics of Bos indicus cattle undergoing repeated ovum pick-up sessions.** *Reproduction in Domestic Animals*, 57(1), 55-63, 2022.

NEGLIA, GIANLUCA, BIANCA GASPARINI, DOMENCIO VECCHIO, LUCIA BOCCIA, ETTORE VARRICCHIO, ROSSELLA DI PALO, LUIGI ZICARELLI, GIUSEPPE CAMPANILE. **"Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species."** *Animal reproduction science* 123, no. 3-4, 180-186, 2011.

NOLAN, R., O'CALLAGHAN, D., DUBY, R. T., LONERGAN, P., BOLAND, M. P. **The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers.** *Theriogenology*, 50(8), 1263-1274, 1998.

OSPINA, P. A., NYDAM, D. V., STOKOL, T., OVERTON, T. R. **Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases.** *Journal of dairy science*, 93(2), 546-554, 2010.

PALMA, G. A., OLIVIER, N. S., NEUMULLER, C. H., SINOWATZ, F. **Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts.** *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 37(1), 67-73, 2008.

PANDEY, A. N., TRIPATHI, A., PREMKUMAR, K. V., SHRIVASTAV, T. G., CHAUBE, S. K. **Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes.** *Journal of cellular biochemistry*, 111(3), 521-528, 2010.

PAULA-LOPES, F.; CHASE, C.; AL-KATANANI, Y.; KRININGER, C. et al. **Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures.** *Reproduction*, 125, n. 2, p. 285-294, 2003.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M.; TAVERNE, M. A. M. **Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries.** *Theriogenology*, 30, n. 4, p. 751-762, 1988/10/01/ 1988.

POIRIER, M., TESFAVE, D., HAILAY, T., SALILEW-WONDIM, D., GEBREMEDHN, S., RINGS, F., HOELKER, M. **Metabolism-associated genome-**

wide epigenetic changes in bovine oocytes during early lactation. *Scientific reports*, 10(1), 1-13, 2020.

PONTES JHF, MELO FA, BASSO AC, FERREIRA CR, SANCHES BV, RUBIN KCP, 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*. 75(9):1640–1646, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.0263>.

PONTES, JH; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, BV; ERENO-JUNIOR, JC; UVO, S.; BARREIROS, TR; OLIVEIRA, JA; HASLER, JF; SENEDA, MM. **Comparison of embryo production and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore donor cows (*Bos indicus*).** *Theriogenology*, 71, 690-697, 2009.

PWTYIM, S., R. BAGE, T. HALLAP, A-S. BERGQVIST, H. RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, LARSSON. **"Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function."** *Theriogenology* 60, no. 1, 175-188, 2003.

QUEZADA C. A., ROLDÁN, H. P., CANO R., D. E., ESCÁRCEGA A, A. M., ITZA O, M. F., CARRERA C, J. M., OROZCO L., E. **Corpora lutea affect in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes and embryonic development after fertilization with sex-sorted or conventional semen.** *Tropical Animal Health and Production*, 52, 3493-3499, 2020.

RABIEE, A. R., LEAN, I. J., STEVENSON, M. A., SOCHA, M. T. **Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis.** *Journal of Dairy Science*, 93(9), 4239-4251, 2010.

REED, B. K., HUNT, C. W., SASSER, R. G., MOMONT, P. A., RODE, L. M., KASTELIC, J. P. **Effect of forage: concentrate ratio on digestion and reproduction in primiparous beef heifers.** *Journal of animal science*, 75(7), 1708-1714, 1997.

REVEL, F., MERMILLOD, P., PEVNOT, N., RENARD, J., HEYMAN, Y. **Low developmental capacity of matured and in vitro fertilized oocytes from calves compared to cows.** *Journal of Reproduction and Fertility*, 103, 115-120, 1995.

RIENZI, L., BALABAN, B., EBNER, T., MANDELBAUM, J. **The oocyte.** *Human Reproduction*, v. 27, n. suppl_1, p. i2-i21, 2012.

RIZOS, D., CLEMENT, M., BERMEJO-AIVAREZ, P., de LA FUENTE, J., LONERGAN, P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A. **Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality.** *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 44-50, 2008.

ROCHE, J. F. **The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency.** *Animal reproduction science*, 96(3-4), 282-296, 2006.

ROCHE, J. R., BERRY, D. P., DELABY, L., DILLON, P. G., HORAN, B., MACDONALD, K. A., NEAL, M. **New considerations to refine breeding objectives of dairy cows for increasing robustness and sustainability of grass-based milk production systems.** *Animal*, 12(s2), s350-s362, 2018.

ROTH, Z., HANSEN, P. J. **Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.** *Reproduction*, 129(2), 235-244, 2005.

RUMPF, R. **Methodological advances on in vitro embryo production.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 229-233, 2007.

SÁ, NAIZA AR. **Anethole supplementation during oocyte maturation improves in vitro production of bovine embryos.** *Reproductive Sciences*, v. 27, p. 1602-1608, 2020.

SAAD, M., SARWAR, Z., SALEEM, M., ARSHAD, U., SHAHZARD, M., MUSHTAQ, M. H., AHMAD, N. **Effect of plasma progesterone on oocyte recovery, oocyte quality, and early in-vitro developmental competence of embryos in *Bos indicus* dairy cows.** *Animal reproduction science*, 202, 80-86, 2019.

SAKATANI, MIKI. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 347-352, 2017.

SAKATANI, MIKI; KOBAYASHI, SHU-ICHI; TAKAHASHI, MASASHI. **Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative status of pre-implantation bovine embryos.** *Molecular Reproduction Development*, v. 67, n. 1, pág. 77-82, 2004.

SALES JN, IGUMA LT, BATISTA RI, QUINTÃO CC, GRAMA MA, FREITAS C, PEREIRA MM, CAMARGO LS, VIANA JH, SOUZA JC, BARUSELLI OS. **Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows.** *Journal Dairy Science*, 98: 3086–3099, 2015.

SANTOS, J. E. P., BISIONOTTO, R. S., RIVEIRO, E. S., LIMA, F. S., GRECO, L. F., STAPLES, C. R., PATE, J. L. **Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle.** *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, 387-403, 2011

SARTORI, R.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, P. L. J.; MELO, L. F. **Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction.** *Theriogenology*, 86, n. 1, p. 32-40, 2016/07/01/ 2016.

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

SATRAPA, R.A., CASTILHO, A.S., RAZZA, E.M., PEGORER, M.F., PUELKER, R., BARROS, C.M (2013). **Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows.** *Animal reproduction science*, v. 138, n. 3-4, p. 155-158, 2013.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. **Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows.** *Reproduction*, v. 88, n. 2, p. 581-591, 1990.

SHEHAB-EL-DEEN MAM, LEROY JLMR, FADEL MS, SALEH SYA, MAES D, VAN SOOM A. **Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum.** *Animal Reproduction Science* 2010; 117: 189–2010.

SHEN, P. C., LEE, J. W., CHENG, W. T. K., SU, H. Y., LEE, S. N., LIU, B. T. JU, J. C. **Differential thermal sensitivity between the recipient ooplasm and the donor nucleus in Holstein and Taiwan native yellow cattle.** *Theriogenology*, 74(9), 1587-1595, 2010.

SIES, HELMUT. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress.** *Redox biology*, v. 11, p. 613-619, 2017.

SILVA, C. F., SRTORELLI, E. S., CASTILHO, A. C. S., SATRAPA, R. A., PUELKER, R. Z., RAZZA, E. M., BARROS, C. M. **Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro.** *Theriogenology*, 79(2), 351-357, 2013.

SIMMONS, R., TUTT, D. A., GUVEN-ATES, G., KWONG, W. Y., LABRECQUE, R., RANDI, F., SINCALIR, K. D. **Enhanced progesterone support during stimulated cycles of transvaginal follicular aspiration improves bovine in vitro embryo production.** *Theriogenology*, 2023.

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

SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. **Oocyte maturation and IVF in cattle.** *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1-4, p. 417-426, 1996.

SMITH, D. L., STINEFELT, B. M., BLEMINGS, K. P., WILSON, M. E. **Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes.** *J. Anim. Sci.* 84, 1102– 1109. 2006.

SMITH, L. C., OLIVERA-ANGELIA, M., GROOME, N. P., BHATIA, B., PRICE, C. A. **Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle.** *Reproduction*, 106(2), 193-199, 1996.

SOOM, A. V., BOERIAN, M. L., BOLS, P. E., VANROOSE, G., LEIN, A., CORYN, M., KRUIF, A. D. **Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation.** *Biology of reproduction*, 57(5), 1041-1049, 1997.

- SPIEKERS, H., KLUNTER, A. M., POTTHAST, V., PFEFFER, E. (1991). **Effects of different concentrate levels on milk yield, feed intake, live weight change, health and reproduction in dairy cows.** *Livestock Production Science*, 28(2), 89-105, 1991.
- SUCCU, S. et al. **Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring.** *Journal of dairy science*, v. 103, n. 12, p. 11957-11969, 2020.
- SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A. **Cryptolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts.** *Reproduction, Fertility and Development*, 26, n. 8, p. 1129-1141, 2014.
- SUGULLE, ABUKAR HASSAN; DOCHI, OSAMU; KOYAMA, HISAICHI. **Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue Staining: Effect of the presence of corpus luteum on embryo development.** *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 25, n. 1, p. 50-55, 2008.
- TOMITA, K., ISHII, T., ENDO, N., TANAKA, T. **Effects of short-term dietary supplementation on the number of ovarian follicles, quantity and quality of oocytes, and in vitro embryo production in Japanese Black cows.** *Journal of Reproduction and Development*, 69(2), 65-71, 2023.
- TORRES-JÚNIO, J. D. S., DE FA PIRES, M., De Sá, W. F., FERREIRA, A. D. M., VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. D. A., BARUSELLI, P. S. **Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle.** *Theriogenology*, 69(2), 155-166, 2008.
- TORRES-MORENO, M., TORRESCASANA, E., SALA-SALVADO, J., BLANCH, C. **Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions.** *Food chemistry*, 166, 125-132, 2015.
- TRAUT, M., KOWALCZYK-ZIEBA, I., BORUSZEWSKA, D., JAWORSKA, J., LUKASZUK, K., WOCLAWEK-POTOCKA, I. **Mitochondrial DNA content and developmental competence of blastocysts derived from pre-pubertal heifer oocytes.** *Theriogenology*, 191, 207-220, 2022.
- TRAVNICKOVA, I., HULINSKA, P., KUBICHOVA, S., HAZNALOVA, K., KEMPYST, B., NEMCOVA, L., MACHATKPOVA, M. **Production of sexed bovine embryos in vitro can be improved by selection of sperm treatment and co-culture system.** *Reproduction in Domestic Animals*, 56(6), 864-871, 2021.
- VANHOLDER, T., LEROY, J. L. M. R., VAN SOOM, A., OPSOMER, G., MAES, D., CORYN, M., KRUIF, A. **Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro.** *Animal reproduction science*, 87(1-2), 33-44, 2005.

VIANA, J. H. M., NASCIMENTO, A. A., PINHEIRO, N. L., FERREIRA, A. M., CAMARGO, L. S., Sá, W. F., MARQUES JUNIOR, A. P. **Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 23, 119-124, 2003.

VIANA, JOÃO. **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals.** Boletim Embryo Technology, v. 36, n. 4, pág. 17 de 2020.

VIANNA, J. H. M., DE AIMEIDA CAMARGO, L. S., DE MORAES FERREIRA, A., DE SA, W. F., DE CARVALHO FERNANDES, C. A., JUNIOR, A. D. P. M. **Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (Bos indicus) of cattle.** Animal reproduction science, 84(1-2), 1-12, 2004.

VIEIRA, L. M., RODRIGUES, C. A., MENDANHA, M. F., SÁ FILHO, M. F. D., SALES, J. N. D. S., SOUZA, A. H., BARUSELLI, P. S. **Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle.** Theriogenology, 82(2), 204-212, 2014.

WARD, F., RIZOS, D., CORRIDAN, D., QUINN, K., BOLAND, M., LONERGAN, P. **Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo.** Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 60(1), 47-55, 2001.

WASIELAK, M., BOGACKI, M. **Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes.** Journal of Reproduction and Development, 53(2), 419-426, 2007.

WASILAK, M., BOGACHI, M;(2007). **Inibição do apoptose pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-I durante a maturação in vitro de oócitos bovinos.** Journal.Reproduction. Dev., 53 (2) (2007), pp. 419 - 426,10.1262/jrd.18076.

WATANABE, YF, DE SOUZA, AH, MINGOTI, RD, FERREIRA, RM, BATISTA, EOS, DAYAN, A., BARUSELLI, PS. **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, 2017.

WATHES, D. C., TAYLOR, V. J., CHENG, Z., MANN, G. E. **Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows.** Reproduction supplement, 61, 219-237, 2003.

WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. **Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA.** Theriogenology, 52, n. 8, p. 134-1352, 1999/12/01/ 1999.

WILTBANK, M. C., SOUZA, A. H., CARVALHO, P. D., BENDER, R. W., NASCIMENTO, A. B. **Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle.** *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 238-243, 2011.

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

XU, J., GUO, Z., SU, L., NEDEMBALE, T. L., ZHANG, J., SCHENK, J., DU, F. **Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm.** *Journal of dairy science*, 89(7), 2510-2518, 2006.

YAAKUB, H., CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. **Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers.** *Theriogenology* 51, 1259–1266, 1999.

ZERON, Y., OCHERETNY, A., KEDAR, O., BOROCHOY, A., SKLAN, D., ARAY, A. **Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles.** *Reproduction*, 121(3), 447-454, 2000.

SEGUNDA PARTE

Artigo científico formatado de acordo com regras da revista Theriogenology (Versão preliminar)

Eficiência da produção *in vitro* de embriões de doadoras e touros Holandês, Gir e Girolando em clima tropical

Lorena Lima Firmino^a João Pedro Araújo Campos^b Renato Ribeiro de Lima^c Felipe Costa Gonçalves^b Nadja Gomes Alves^a

^a Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^b Agroopegen, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil.

^c Departamento de Estatística, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

Autor correspondente: nadja@ufla.br, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Destaques

- 1) Doadoras Holandesas produziram menos oócitos do que doadoras Gir e Girolando.
- 2) Doadoras Holandesas produziram mais oócitos viáveis no inverno do que nas demais estações.
- 3) A taxa de clivagem variou de acordo com o genótipo do embrião e a estação do ano.
- 4) A produção de embriões foi influenciada pelo touro utilizado na fertilização.

30

Resumo

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

A PIVE de bovinos desempenha papel fundamental no avanço genético dos rebanhos leiteiros. Todavia, muitos fatores podem interferir no sucesso da técnica, sejam estes relacionados à vaca doadora, ao touro e aos processos laboratoriais. Este estudo teve como objetivo identificar os principais fatores que interferem nos resultados da PIVE de vacas leiteiras. O banco de dados incluiu informações relacionadas à PIVE comercial de doadoras Holandês (HO; n= 393 doadoras; 575 rotinas), Gir (n= 156 doadoras; 249 rotinas) e $\frac{3}{4}$ Holandês x Zebu (Girolando; n= 103 doadoras; 110 rotinas), bem como informações sobre o grupamento genético do touro, nome da doadora e do touro, estação do ano em que foi realizada a OPU, número de oócitos viáveis, desnudos e irregulares coletados, maturados e cultivados, número de embriões clivados e de embriões produzidos e dados dos técnicos que realizaram a seleção e a classificação dos oócitos. Todas as sessões de OPU e todas as rotinas para PIVE foram realizadas por um único técnico e em todas as rotinas foi utilizado sêmen sexado de fêmea. O número de oócitos coletados de doadoras HO ($12,57 \pm 0,76$) foi menor ($P < 0,05$) do que de doadoras Gir ($18,11 \pm 1,23$) e Girolando ($20,85 \pm 1,58$), mas não houve diferença ($P > 0,05$) entre doadoras Gir e Girolando. O número de oócitos viáveis coletados de doadoras HO no inverno ($5,18 \pm 0,47$) foi maior ($P < 0,05$) do que na primavera ($3,96 \pm 0,40$), verão ($4,94 \pm 0,57$) e outono ($4,18 \pm 0,46$), contudo, as estações do ano não influenciaram ($P > 0,05$) o número de oócitos viáveis coletados de doadoras Gir e Girolando (Interação grupamento genético da doadora e a estação do ano, $P < 0,05$). O grupamento genético do touro dentro da combinação grupamento genético da doadora x estação do ano influenciou a taxa de clivagem (TC, $P < 0,05$) e de embriões produzidos em relação ao total de oócitos ($P < 0,05$) e em relação a embriões clivados ($P < 0,05$). A TC de embriões com genótipo HO x HO não diferiu ($P > 0,05$) entre as estações do ano, contudo, a TC de embriões com genótipo HO X Gir foi maior ($P < 0,05$) na primavera ($58,31 \pm 2,95\%$) do que no inverno ($45,05 \pm 2,54\%$). A TC de doadoras Girolando e a taxa de produção de embriões de doadoras Gir, no inverno, foram reduzidas ($P < 0,05$) pela utilização de sêmen de touros do mesmo grupamento genético da doadora. As taxas de clivagem e de produção de embriões de doadoras HO e Gir variaram em função do touro utilizado na fertilização. Estes resultados oferecem novas perspectivas relacionadas à PIVE, as quais são essenciais para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no uso da técnica.

Palavras-chave: Blastocisto. Oócito. Raça. Sêmen sexado. Taxa de clivagem.

63 1. Introdução

64 A pecuária leiteira é de grande importância para a produção de alimentos. Dentre
65 as raças utilizadas mundialmente para produção de leite, destacam-se as de genótipo *Bos*
66 *taurus taurus*, como a Holandês. Contudo, nos trópicos, é comum a produção de leite
67 de animais *Bos taurus indicus* e mestiços devido à maior adaptabilidade destes ao
68 ambiente e à menor susceptibilidade ao estresse térmico por calor [1, 2]. Em
69 contrapartida, a capacidade produtiva em animais mais adaptados ao clima tropical
70 ainda é relativamente baixa quando comparados à raça Holandês. Diante disso, faz-se
71 necessário o uso de biotecnologias que proporcionem melhoramento genético dos
72 rebanhos de animais mestiços e zebuínos.

73 Nesse sentido, as tecnologias da reprodução assistida, como a produção *in vitro* de
74 embriões (PIVE), desempenham papel fundamental no avanço da pecuária leiteira [3],
75 principalmente pela possibilidade do uso do sêmen sexado [4] e seleção genômica [5].
76 O uso da PIVE permite que se obtenha maior número de descendentes por vaca ao longo
77 de sua vida [6] e maior número de possíveis doadoras, uma vez que podem ser aspirados
78 oócitos de bezerras pré-púberes [7,8], vacas cíclicas não gestantes, vacas prenhes até o
79 primeiro trimestre de gestação e vacas no pós-parto [9], além de vacas com problemas
80 anatômicos [10]. Ademais, a otimização do uso do sêmen, pois é necessário menor
81 número de espermatozoides para produção de embriões [11], comparado ao número de
82 espermatozoides nas palhetas utilizadas na inseminação artificial *in vivo*.

83 Todavia, mesmo com o avanço da técnica, a qualidade dos embriões produzidos
84 permanece como um dos grandes desafios encontrados na PIVE. A proporção de
85 anormalidades cromossômicas, bem como a expressão gênica anormal são maiores em
86 embriões de PIVE [12], ademais, os padrões de metilação do DNA são alterados, há
87 maior acúmulo de lipídeos intracelulares que pode resultar na redução da viabilidade
88 embrionária e menor criotolerância [13]. Estima-se que apenas 27% das vacas que
89 recebem embriões provenientes da PIVE conseguem levar a gestação a termo e produzir
90 um bezerro vivo [14]. Outras limitações também podem ser citadas, como inadequada
91 maturação citoplasmática e redução da qualidade oocitária após a maturação *in vitro*
92 (MIV) [15], fase que é determinante para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto
93 [14], problemas com os meios de maturação, fertilização e cultivo, principalmente em
94 suas formulações e composições [15], menor produção de embriões quando se trata do
95 uso do sêmen sexado [16] e menor tolerância dos embriões aos processos de congelamento

96 [15], resultando em menor taxa de prenhez quando comparados a embriões produzidos
97 *in vivo* [14].

98 Fatores inerentes à execução da técnica também podem influenciar os resultados,
99 como a habilidade dos técnicos que realizam a aspiração dos oócitos e os procedimentos
100 laboratoriais [17]. Fatores inerentes aos animais, como a raça [11], a idade [8], e o estado
101 nutricional das doadoras [18], características do touro e do sêmen [19] e fatores
102 relacionados ao ambiente em que as doadoras são mantidas, como o estresse térmico
103 por calor [20] também podem influenciar a PIVE de embriões. Portanto, a hipótese do
104 trabalho é que vacas taurinas produzem menor número de oócitos viáveis e,
105 conseqüentemente, de embriões do que vacas zebuínas e mestiças, especialmente na
106 primavera e no verão, devido aos efeitos do estresse térmico por calor. Além disso, é
107 possível que o GG do touro utilizado na fertilização altere as taxas de clivagem e
108 produção de embriões.

109 Desta forma, os objetivos deste estudo são, a partir de um banco de dados de
110 laboratório comercial, comparar o número de oócitos fornecidos por vacas de diferentes
111 grupamentos genéticos, analisar a contribuição do touro e o efeito da estação do ano nas
112 taxas de clivagem e de produção de embriões.

113 **2. Material e métodos**

114 **2.1 Banco de dados**

115 No presente estudo foram analisados dados de 934 sessões de aspiração folicular
116 guiada por ultrassonografia (OPU) e subsequentes rotinas de PIVE realizadas entre
117 outubro de 2019 a maio de 2022, em 27 fazendas localizadas no sul de Minas Gerais e
118 norte de São Paulo, Brasil. O banco de dados foi cedido por um laboratório comercial
119 de PIVE bovinos, situado em Pouso Alegre, MG, Brasil (Agroopegen).

120 As informações contidas no banco de dados analisado incluíram fazenda, nome e
121 grupamento genético da doadora, estação do ano em que foi realizada a OPU, nome e
122 grupamento genético do touro utilizado na fertilização *in vitro* (FIV), bem como o
123 número de complexos cumulus-oócitos (COCs) viáveis e irregulares e de oócitos
124 desnudos obtidos de cada doadora em cada sessão de OPU e maturados *in vitro* (MIV),
125 o número de embriões clivados no dia dois de cultivo *in vitro* (CIV) e o número de
126 embriões produzidos no dia sete, de cada doadora. Todas as sessões de OPU, bem como

127 o processo laboratorial de PIVE, foram realizados por um técnico experiente, enquanto
128 a seleção e classificação dos COCs nas fazendas foram realizadas por quatro técnicos.

129 Os COCs foram obtidos de doadoras Holandês (HO, 393 doadoras em 575 rotinas
130 de PIVE), Gir (GIR, 156 doadoras em 249 rotinas) e mestiças $\frac{3}{4}$ Holandês x Gir
131 (Girolando, 100 doadoras em 110 rotinas). O sêmen utilizado nas rotinas foi de touros
132 HO (n = 45 touros em 803 rotinas), Gir (n = 16 touros em 119 rotinas) e mestiços $\frac{3}{4}$
133 Holandês x Gir (n = 4 touros em 12 rotinas).

134 **2.2 Aspiração folicular, classificação e seleção de oócitos**

135 As aspirações foliculares foram realizadas em dia aleatório do ciclo estral por meio
136 da técnica de OPU [22], usando ultrassom em modo B em tempo real, equipado com
137 transdutor convexo de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Shenzhen, China). Folículos
138 maiores que 2 mm de diâmetro foram aspirados com agulha descartável 20G conectada
139 a um tubo falcon de 50mL contendo solução tampão fosfato salina (DMPBS, Biodux,
140 Campinas, Brasil) e 125 UI/mL de heparina (Liquemine, Laboratório Roche, São Paulo,
141 SP, Brasil) a 37°C. A OPU foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo (WTA,
142 Cravinhos, Brasil) com pressão negativa de 90 mmHg.

143 Imediatamente após a OPU, os COCs foram lavados com solução tampão fosfato
144 salina (DMPBS, Biodux, Campinas, Brasil) com filtro de malha 100 micras e colocados
145 em placas de Petri descartáveis de 60 mm de diâmetro contendo a mesma solução de
146 lavagem. Os COCs foram visualizados usando microscópio estereoscópio e
147 classificados quanto à sua qualidade em graus I, II, III, desnudos e irregulares, de acordo
148 com a avaliação das células do cummulus e integridade do citoplasma, conforme
149 descrito em [23]

150 • Grau I: COCs compactos, mais de três camadas de células do cummulus e oócito
151 com citoplasma homogêneo.

152 • Grau II: COCs compactos com três ou menos camadas de células do cummulus,
153 oócitos com citoplasma levemente heterogêneo.

154 • Grau III: oócitos parcialmente desnudos, com ausência das células do cummulus
155 em pelo menos 1/3 da superfície da zona pelúcida.

156 • Desnudos e/ou degenerados: oócitos sem células do cummulus na maior parte
157 da superfície da zona pelúcida e ou vacuolização e encolhimento do citoplasma.

158 • Irregulares: COCs que apresentam expansão das células do cummulus e ou
159 citoplasma irregular.

160 Os COCs viáveis (Graus I, II e III), bem como, COCs desnudos e irregulares foram
161 utilizados.

162 **2.3 Produção *in vitro* de embriões**

163 Logo após classificação, os COCs foram transferidos para microtubos de 2 mL com
164 500 µL de meio de maturação *in vitro* comercial (Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo,
165 Brasil) e cobertos com 250 µL de óleo de silicone (Quimesp, Guarulhos, SP). Em cada
166 microtubo foram acondicionados no máximo 50 oócitos. Os microtubos foram
167 gaseificados com uma mistura gasosa padrão (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) antes de
168 serem fechados e foram transportados para o laboratório em transportadora de oócitos
169 (WTA, Cravinhos, Brasil) a 38,5 °C. Os procedimentos de MIV, FIV e CIV foram
170 realizados de acordo com os padrões e protocolos da empresa comercial. De forma
171 resumida, os microtubos com os COCs foram transferidos para uma incubadora ajustada
172 a 38,5°C, 5,5% de CO₂ e umidade saturada, onde deu-se continuidade à MIV. A MIV
173 ocorreu por 24h, contadas a partir do momento que os COCs foram colocados nos
174 microtubos.

175 Os COCs maturados foram lavados três vezes em gotas de meio FIV (Tyrode's
176 albumin lactate piruvate; TALP; Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo, Brasil) acrescido
177 de heparina e PHE (Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina) e alocados em microgotas
178 de 40 µL dispostas em placas de 35 mm, cobertas com óleo de silicone (Quimesp,
179 Guarulhos, SP), previamente estabilizadas em incubadora por período *overnight*. Foram
180 utilizadas doses de sêmen sexado para fêmea de touros Holandês, Gir e Girolando. As
181 palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 45 segundos, seguido de
182 centrifugação do sêmen a 2400 x G por 5 minutos e separação por gradiente com duas
183 colunas Percoll (colunas de 200 µL de Percoll 45% e 200 µL de Percoll 90% dispostas
184 em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL). O *pellet* obtido após a centrifugação foi lavado em

185 1 mL de meio FIV e submetido a uma nova centrifugação a 300 x G por 2 minutos. O
186 *pellet* foi retirado e o volume ajustado para atingir uma concentração da dose de
187 inseminação de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A dose inseminante foi então adicionada
188 às gotas de FIV e os gametas foram mantidos em co-cultivo por 18h em incubadora a
189 38,5°C e 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. Os presumíveis zigotos foram desnudados
190 e lavados três vezes em gotas de meio CIV (Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo, Brasil)
191 e, em seguida, cultivados em microgotas de 100 µL de meio CIV SOF (Synthetic oviduct
192 fluid; Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo, Brasil) suplementado com 5% de SFB,
193 submersas em óleo de silicone, em placas de 35 mm, em atmosfera controlada a 38,5°C
194 e 5,5 % CO₂ e 5% O₂ por 144 h. A avaliação da clivagem foi realizada em 48 h pós-
195 fertilização. A formação de blastocistos foi determinada em 168 h pós-fertilização,
196 quando os embriões foram avaliados e classificados quanto ao estágio de
197 desenvolvimento e qualidade morfológica de acordo com os padrões da International
198 Embryo Transfer Society.

199 **2.4 Análise estatística**

200 As análises estatísticas foram realizadas por modelos lineares generalizados usando
201 o procedimento GLIMMIX do software SAS (Statistical Analysis System, OnDemand
202 for Academics). Os resultados são apresentados como lsmeans ± erro padrão da média
203 e efeito significativo foi assumido quando $P < 0,05$.

204 **2.4.1 Número total de oócitos, número de oócitos viáveis e porcentagem de oócitos** 205 **viáveis**

206 Inicialmente, as variáveis doadora, fazenda e técnico da seleção da OPU foram
207 consideradas como efeitos aleatórios e as variáveis raça da doadora e estação do ano em
208 que a OPU foi realizada e a interação raça da doadora x estação do ano como efeitos
209 fixos. Como o efeito aleatório de técnico que selecionou os oócitos não foi significativo,
210 este efeito foi desconsiderado nesta análise e nas posteriores. A interação raça da
211 doadora x estação do ano foi mantida no modelo se significativa a $P < 0,05$. A
212 distribuição de Poisson e função de ligação Log foi considerada na análise do número
213 total de oócitos e número de oócitos viáveis. A distribuição binomial e função de ligação
214 Logit foi considerada na análise da porcentagem de oócitos viáveis.

215 **2.4.2 Taxas de clivagem e de produção de embriões**

216 **2.4.2.1 Efeito da raça do touro**

217 As taxas de clivagem e de embriões produzidos em relação ao número total de
218 oócitos maturados e a taxa de embriões produzidos em relação aos clivados foram
219 analisadas considerando o efeito aleatório de doadora e os efeitos fixos de raça da
220 doadora, estação do ano, interação raça da doadora x estação do ano e raça do touro
221 dentro da interação raça da doadora x estação do ano. As covariáveis número de oócitos
222 viáveis, desnudos e irregulares foram inicialmente consideradas na análise das taxas em
223 relação ao total de oócitos maturados, porém o número de oócitos viáveis não foi
224 significativo e foi removido do modelo. Os dados foram analisados considerando a
225 distribuição binomial e função de ligação Logit.

226 **2.4.2.2 Efeito individual de touro**

227 A taxa de clivagem em relação ao número total de oócitos e taxa de embriões
228 produzidos em relação ao total de oócitos maturados foram analisadas considerando o
229 efeito aleatório de doadora, as covariáveis número de oócitos viáveis, desnudos
230 irregulares e os efeitos fixos de raça da doadora, estação do ano, interação raça da
231 doadora x estação do ano e touro dentro de raça da doadora. A covariável número de
232 oócitos viáveis não foi significativa na análise da taxa clivagem e foi removida do
233 modelo. Os dados foram analisados considerando a distribuição binomial e função de
234 ligação Logit.

235 **3. Resultados**

236 **3.1 Número total de oócitos, número de oócitos viáveis e porcentagem de oócitos** 237 **viáveis**

238 O número total de oócitos obtidos de doadoras Holandês, Gir e Girolando foi de
239 $12,57 \pm 0,76$; $18,11 \pm 1,23$; $20,85 \pm 1,58$, respectivamente. Doadoras da raça Holandesa
240 produziram menos oócitos ($P < 0,05$) do que doadoras Gir e Girolando, contudo, não
241 houve diferença ($P > 0,05$) entre doadoras Gir e Girolando.

242 A interação raça da doadora x estação do ano influenciou o número e a porcentagem
243 de oócitos viáveis (Tabela 1). O número e a porcentagem de oócitos viáveis foram
244 maiores ($P < 0,05$) no inverno do que nas outras estações do ano na raça Holandesa. O

245 número de oócitos viáveis foi menor ($P < 0,05$) na raça Holandesa do que nas demais
 246 raças, em todas as estações do ano. Contudo, o número e a porcentagem de oócitos
 247 viáveis produzidos por doadoras Gir e Girolando não diferiu ($P > 0,05$) entre as estações
 248 do ano.

249 A porcentagem de oócitos viáveis obtidos de vacas Holandesas na primavera foi
 250 menor do que a obtida de vacas Girolando ($P < 0,05$), mas não diferiu ($P > 0,05$) da
 251 observada em vacas Gir. Ademais, no inverno, menor porcentagem de oócitos viáveis
 252 foram obtidos de vacas Holandesas do que de vacas Gir ($P < 0,05$), mas a porcentagem
 253 de oócitos viáveis de vacas Girolando não diferiu ($P > 0,05$) das demais.

254 **Tabela 1 - Número e porcentagem de oócitos viáveis coletados de vacas leiteiras**
 255 **nas estações do ano (Ismeans \pm erro padrão)**

Raça da doadora	Oócitos viáveis			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Holandês	3,96 \pm 0,40 ^{aA}	4,94 \pm 0,57 ^{aA}	4,18 \pm 0,46 ^{aA}	5,18 \pm 0,47 ^{bA}
Gir	8,88 \pm 1,24 ^{aB}	8,34 \pm 0,85 ^{aB}	8,46 \pm 0,93 ^{aB}	10,28 \pm 1,13 ^{aB}
3/4 Girolando	11,88 \pm 1,88 ^{aB}	10,84 \pm 2,19 ^{aB}	9,31 \pm 1,74 ^{aB}	10,10 \pm 1,24 ^{aB}
% de oócitos viáveis				
Holandês	34,37 \pm 2,8 ^{aA} (798/2058)	39,07 \pm 3,27 ^{aA} (592/1512)	35,79 \pm 3,09 ^{aA} (516/1248)	42,07 \pm 2,68 ^{bA} (2083/4610)
Gir	51,07 \pm 4,52 ^{aAB} (360/706)	50,31 \pm 2,98 ^{aA} (1057/1983)	50,67 \pm 3,47 ^{aA} (532/956)	58,97 \pm 3,32 ^{aB} (600/1131)
Girolando	63,13 \pm 5,18 ^{aB} (324/489)	46,06 \pm 5,34 ^{aA} (193/390)	46,74 \pm 5,09 ^{aA} (321/612)	50,99 \pm 3,65 ^{aAB} (855/1679)

256
 257 ^{ab} Resultados seguidos de letras minúsculas diferentes nas linhas denotam diferenças entre as
 258 estações do ano em uma mesma raça de vacas doadoras ($P < 0,05$) no teste de Tukey-Kramer.
 259

260 ^{AB} Resultados seguidos de letras maiúsculas diferentes nas colunas denotam diferenças entre as raças
 261 de vacas doadoras em uma mesma estação do ano ($P < 0,05$) no teste Tukey-Kramer.
 262

263 n= número de oócitos viáveis em relação ao número total de oócitos
 264
 265

3.2 Taxas de clivagem e de produção de embriões

Na análise das taxas de clivagem e de produção de embriões em relação ao total de oócitos e em relação ao número de embriões clivados observou-se efeito da raça do touro dentro da interação raça da doadora x estação do ano ($P < 0,05$). A taxa de clivagem de embriões Holandês foi maior na primavera do que no inverno ($P < 0,05$, Tabela 2). Ao considerar a raça do touro, observou-se que a taxa de clivagem de embriões com genótipo Holandês x Holandês não diferiu entre as estações do ano, no entanto, maior taxa de clivagem de embriões com genótipo Holandês x Gir foi observada na primavera do que no inverno ($P < 0,05$, Tabela 2). Todavia, mesmo com as variações na taxa de clivagem, não houve diferença ($P > 0,05$) entre as estações do ano nas taxas de produção de embriões em relação ao total de oócitos (Tabela 3) e em relação ao número de embriões clivados (Tabela 4) em ambos os genótipos.

Maior ($P < 0,05$) taxa de clivagem de embriões Gir foi observada no inverno do que na primavera e no verão. Considerando a raça do touro utilizado na fertilização, observamos que no genótipo Gir x Holandês a taxa de clivagem foi maior ($P < 0,05$) no outono do que na primavera (Tabela 2), enquanto a taxa de embriões produzidos em relação ao total de oócitos foi maior ($P < 0,05$) no verão do que na primavera (Tabela 3). No genótipo Gir x Gir a maior ($P < 0,05$) taxa de clivagem foi observada no inverno do que no verão (Tabela 2), mas não houve diferença nas taxas de embriões produzidos entre as estações do ano (Tabelas 3 e 4). Ademais, a produção de embriões em relação ao total de oócitos e em relação ao número de embriões clivados no inverno foi menor ($P < 0,05$) quando os oócitos de doadoras Gir foram fertilizados com sêmen de touro Gir do que quando fertilizados com sêmen de Holandês, sugerindo um efeito da raça do touro utilizado da fertilização (Tabelas 3 e 4).

A taxa de clivagem de embriões Girolando foi maior no outono do que na primavera e inverno ($P < 0,05$, tabela 2). Ao considerara a raça do touro utilizado na fertilização, verificamos que a taxa de clivagem de embriões com genótipo Girolando x Holandês foi maior ($P < 0,05$) no outono do que na primavera, enquanto a de embriões com genótipo Girolando x Girolando não diferiu ($P < 0,05$) entre as estações. A taxa de clivagem no inverno foi maior ($P < 0,05$) quando oócitos de doadoras Girolando foram fertilizados com sêmen de Holandês do que quando fertilizados com sêmen de Girolando. Entretanto, a taxa de embriões produzidos em relação ao total de oócitos e

298 em relação ao número de embriões clivados não diferiram ($P < 0,05$) entre as estações do
 299 ano, em ambos os genótipos.

300 Tabela 2 - Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na
 301 taxa de clivagem em relação ao total de oócitos (Ismeans \pm erro padrão)

Raça da doadora	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Holandês	55,59 \pm 2,07 ^{aA} (1039/2058)	52,87 \pm 2,36 ^{abA} (811/1512)	52,14 \pm 2,39 ^{abB} (706/1248)	44,95 \pm 1,69 ^{bB} (2108/4610)
Gir	39,96 \pm 3,96 ^{bB} (308/706)	43,82 \pm 2,93 ^{bA} (978/1983)	47,13 \pm 4,35 ^{abB} (475/956)	59,38 \pm 2,98 ^{aA} (612/1131)
3/4 Girolando	45,56 \pm 4,33 ^{bAB} (244/489)	48,13 \pm 10,41 ^{abA} (47/107)	68,08 \pm 3,86 ^{aA} (395/612)	36,79 \pm 3,89 ^{bB} (870/1679)
Raça do touro x Raça da doadora				
Holandês x Holandês	52,85 \pm 2,22 ^a (686/1462)	52,87 \pm 2,36 ^a (811/1512)	52,14 \pm 2,39 ^a (706/1248)	44,85 \pm 1,68 ^a (1530/3397)
Holandês x Gir	58,31 \pm 2,95 ^a (353/596)	-	-	45,05 \pm 2,54 ^b (578/1213)
Gir x Holandês	39,96 \pm 3,96 ^b (308/706)	50,03 \pm 2,33 ^{ab} (858/1724)	55,56 \pm 2,88 ^a (397/780)	52,80 \pm 3,44 ^{ab} (440/835)
Gir x Gir	-	37,78 \pm 5,14 ^b (120/259)	38,86 \pm 7,59 ^{bc} (78/176)	65,64 \pm 4,48 ^{ac} (172/296)
Girolando x Holandês	45,56 \pm 4,33 ^b (244/489)		68,08 \pm 3,86 ^a (395/612)	52,05 \pm 2,95 ^{abA} (807/1395)
Girolando x Girolando	-	48,13 \pm 10,41 ^a (47/107)	-	23,07 \pm 5,50 ^{ab} (63/284)

302 ^{ab} Resultados de doadoras de uma mesma raça seguidos de letras minúsculas diferentes em uma linha
 303 denotam diferenças entre as estações do ano ($P < 0,05$) no teste de Tukey-Kramer.

304 ^{AB} Resultados de doadoras de uma mesma raça seguidos de letras maiúsculas diferentes em uma coluna
 305 denotam diferenças entre a raça do touro utilizado na fertilização ($P < 0,05$) no teste Tukey-Kramer

306 n= número de embriões clivados em relação ao número total de oócitos maturados

307

308

309

310

311

312

313

Tabela 3. Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na taxa de embriões produzidos em relação ao total de oócitos (lsmeans \pm erro padrão)

314

Raça da doadora	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Holandês	9,72 \pm 1,05 ^a (315/2058)	11,84 \pm 1,45 ^a (245/1512)	11,79 \pm 1,39 ^a (207/1248)	10,96 \pm 0,96 ^a (684/4610)
Gir	8,42 \pm 1,81 ^a (85/706)	16,81 \pm 2,15 ^a (445/1983)	15,47 \pm 3,05 ^a (183/956)	14,31 \pm 1,92 ^a (225/1131)
3/4 Girolando	15,69 \pm 2,87 ^a (113/489)	7,05 \pm 4,48 ^a (10/107)	11,07 \pm 2,54 ^a (87/612)	8,87 \pm 1,95 ^a (327/1679)
Raça da doadora x Raça do touro				
Holandês x Holandês	8,18 \pm 0,99 ^a (187/1262)	11,84 \pm 1,45 ^a (245/1512)	11,79 \pm 1,40 ^a (207/1248)	9,22 \pm 0,57 ^a (454/3397)
Holandês x Gir	11,52 \pm 1,58 ^a (128/596)	-	-	12,97 \pm 1,49 ^a (230/1213)
Gir x Holandês	8,42 \pm 1,81 ^b (85/706)	19,31 \pm 1,97 ^a (392/1724)	14,63 \pm 1,88 ^{ab} (149/780)	17,80 \pm 2,57 ^{abA} (162/835)
Gir x Gir	-	14,58 \pm 3,46 ^a (53/259)	16,34 \pm 5,81 ^a (34/176)	11,41 \pm 2,49 ^{abB} (63/296)
Girolando x Holandês	15,69 \pm 2,87 ^a (113/489)	-	11,07 \pm 2,54 ^a (87/612)	12,29 \pm 1,69 ^a (303/1395)
Girolando x Girolando	-	7,50 \pm 4,48 ^a (10/107)	-	6,33 \pm 2,69 ^a (24/63)

315

^{ab} Resultados de doadoras seguidos de letras minúsculas diferentes em uma linha denotam diferenças entre as estações do ano ($P < 0,05$) no teste de Tukey-Kramer.

316

317

^{AB} Resultados de doadoras de uma mesma raça com letras maiúsculas diferentes em uma coluna denotam diferenças entre a raça do touro utilizado na fertilização ($P < 0,05$) no teste Tukey-Kramer

318

319

n= número de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos maturados

320

321

322

323

324

325

326

327

328 Tabela 4. Efeito da estação do ano e da combinação raça do touro x estação do ano na
 329 taxa de embriões produzidos em relação ao número de embriões clivados (Ismeans ±
 330 erro padrão)

Raça da doadora	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Holandês	20,30 ± 2,07 ^{ab} (315/1039)	27,23 ± 2,76 ^{ab} (245/811)	25,24 ± 2,70 ^{aA} (207/706)	23,37 ± 1,92 ^{aA} (684/2018)
Gir	24,71 ± 4,29 ^{abAB} (85/308)	44,49 ± 4,26 ^{aA} (445/978)	37,82 ± 6,02 ^{abA} (183/475)	22,74 ± 3,11 ^{ba} (225/612)
3/4 Girolando	38,56 ± 2,87 ^{aA} (113/244)	15,58 ± 8,60 ^{aAB} (10/47)	17,49 ± 3,71 ^{aA} (87/396)	27,59 ± 5,43 ^{aA} (327/870)
Raça da doadora x raça do touro				
Holandês x Holandês	18,11 ± 2,18 (187/686)	27,23 ± 2,76 (245/811)	25,24 ± 2,79 (207/706)	21,63 ± 1,74 (454/1530)
Holandês x Gir	22,68 ± 9,96 (128/353)	-	-	25,21 ± 3,02 (230/578)
Gir x Holandês	24,71 ± 4,29 (85/308)	43,87 ± 3,39 (392/858)	30,77 ± 3,51 (149/397)	35,23 ± 3,83 ^A (162/440)
Gir x Gir	-	45,11 ± 7,77 (53/120)	45,42 ± 1,58 (34/78)	13,74 ± 3,57 ^B (63/172)
Girolando x Holandês	38,56 ± 5,66 (113/244)	-	17,49 ± 3,71 (87/395)	24,92 ± 3,09 (303/807)
Girolando x Girolando	-	15,58 ± 8,60 (10/47)	-	30,43 ± 10,98 24/63)

331 ^{ab} Resultados de doadoras seguidos de letras minúsculas diferentes em uma linha denotam diferenças
 332 entre as estações do ano (P<0,05) no teste de Tukey-Kramer.

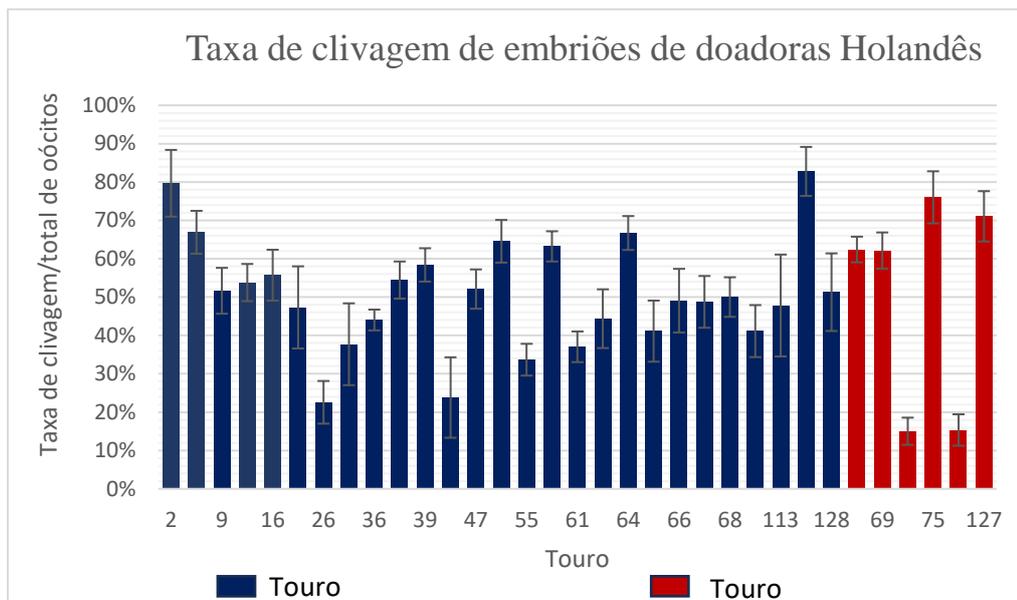
333 ^{AB} Resultados de doadoras de uma mesma raça com letras maiúsculas diferentes em uma coluna
 334 denotam diferenças entre a raça do touro utilizado na fertilização (P<0,05) no teste Tukey-Kramer

335 n= número de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos maturados

336

337 Por fim, outro resultado encontrado em nosso estudo foi o efeito individual do touro
 338 (P<0,05) dentro da raça da doadora. A taxa de clivagem e a taxa de produção de embriões
 339 em relação ao número de oócitos maturados de doadoras Holandês e Gir variaram em
 340 função do touro utilizado na fertilização (Figuras 1-4).

341



342

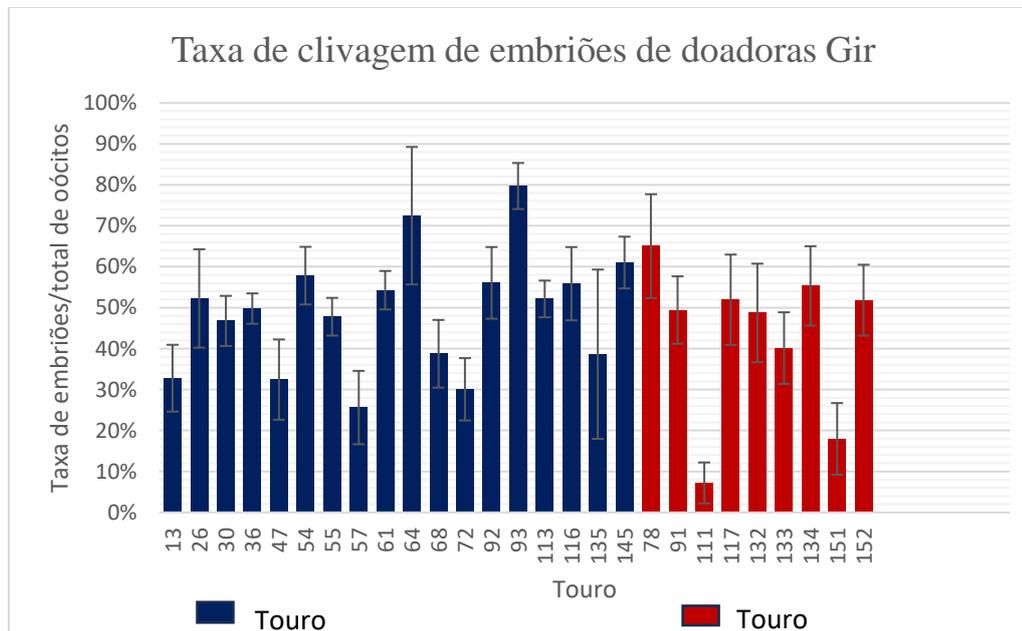
343

344

345

346

Figura 1. Taxa de clivagem de embriões em relação ao número de oócitos de doadoras Holandês fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir



347

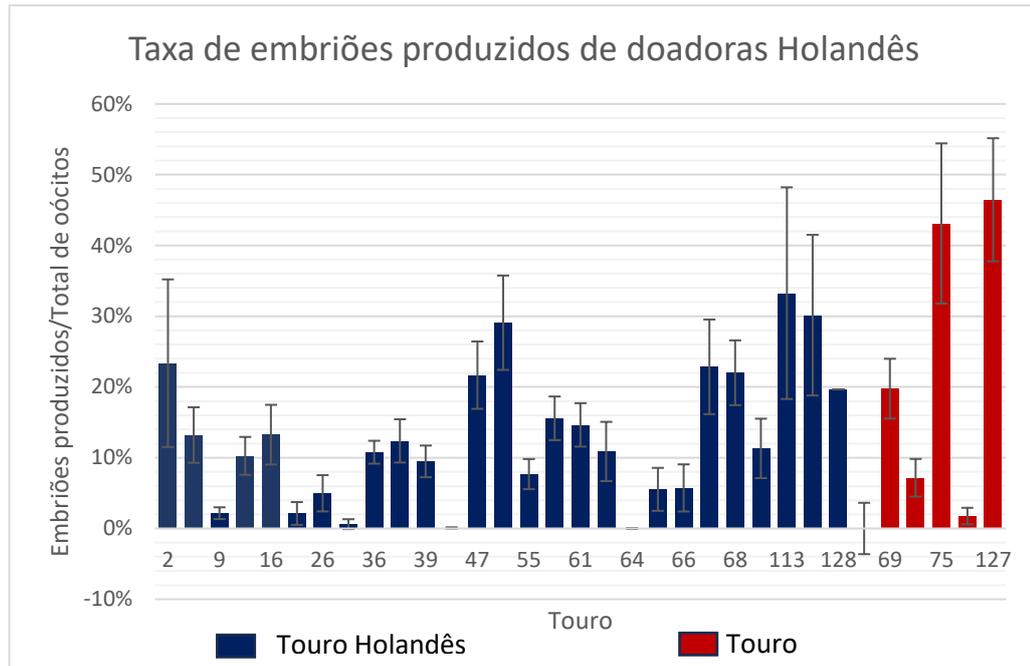
348

349

350

351

Figura 2. Taxa de clivagem de embriões em relação ao número de oócitos de doadoras Gir fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir



352

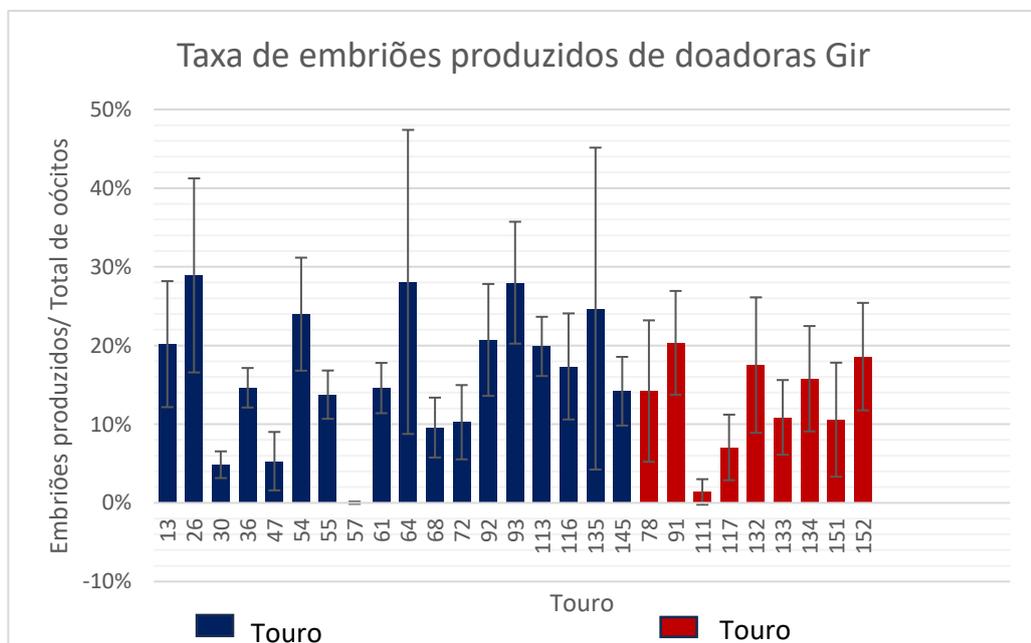
353

354

355

356

Figura 3. Taxa de embriões produzidos em relação ao número de oócitos de doadoras Holandês fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir



357

358

359

360

Figura 4 - Taxa de embriões produzidos em relação ao número de oócitos de doadoras Gir fertilizados com sêmen de diferentes touros das raças Holandês e Gir

4. Discussão

Um dos principais focos deste estudo foi analisar o desempenho das raças de vacas leiteiras na PIVE, uma vez que se dispunha de um banco de dados de laboratório comercial de PIVE em larga escala e três grupos genéticos diferentes: Holandês, Gir e Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*). Muitos autores relataram diferenças importantes nas características reprodutivas em vacas de diferentes genótipos [24-26]. Diferenças no tamanho dos folículos ovulados [26], tamanho do corpo lúteo, concentração de hormônios esteroides [24,27], número de folículos antrais e qualidade oocitária [25,28] e termotolerância oocitária [29, 31] foram descritas. Contudo, fatores ligados às condições de manejo da fazenda, como as instalações [31], bem como o estado nutricional da doadora [18] e o estresse térmico por calor [31] podem comumente influenciar a qualidade oocitária [32-33], e, conseqüentemente, os resultados da PIVE [33].

As doadoras da raça Holandesa forneceram menos oócitos em comparação às doadoras Gir e Girolando. Esses resultados eram esperados, uma vez que nas raças taurinas a contagem folicular antral (CFA) é menor em relação às raças zebuínas [23]. A CFA está relacionada com a maior concentração do hormônio antimuleriano (AMH) nas raças zebuínas [26], que fornecem maior número de oócitos, bem como oócitos de melhor qualidade [26, 34, 36]. As doadoras Girolando forneceram mais oócitos do que as Holandesas, o que pode ser explicado pelo efeito da heterose entre o cruzamento de grupos raciais diferentes [36], embora os maiores efeitos da heterose sejam observados em fêmeas 1/2 Holandês x zebu [37], [8].

Interação entre a raça da doadora e a estação do ano foi observada no número de oócitos viáveis. A raça Holandesa forneceu mais oócitos viáveis nas sessões de OPU realizadas no inverno, em que as temperaturas são mais amenas. Raças taurinas são mais susceptíveis ao estresse térmico [38] devido a sua menor capacidade de dissipação de calor para o ambiente [39] e efeitos negativos na qualidade [40] e maturação oocitária [41] e no subsequente desenvolvimento embrionário são comumente observados [23].

A qualidade oocitária é o principal fator que influencia na taxa de produção de blastocistos [34]. Apesar dos efeitos da raça doadora ser mais expressivo na produção de embriões, este estudo demonstra que a raça do touro, quando avaliada dentro da combinação raça da doadora x estação do ano, exerceu influência na taxa de clivagem e de produção de embriões. No nosso conhecimento este é o primeiro estudo em que o

394 efeito da raça do touro associado a raça da doadora e a estação do ano sobre os resultados
395 da PIV foi avaliado.

396 É interessante observar que a fertilização de oócitos de doadoras da raça
397 Holandês com sêmen de Gir resultou em maior taxa de clivagem de embriões na
398 primavera do que no inverno, enquanto essa diferença não foi observada quando a
399 fertilização ocorreu com sêmen de Holandês. Esse resultado pode estar relacionado à
400 menor porcentagem de oócitos viáveis obtidos de doadoras Holandês na primavera do
401 que no inverno. Portanto, a fertilização com sêmen de Gir favoreceu a clivagem quando
402 oócitos de qualidade inferior foram incluídos na maturação. Ademais, o sêmen de touros
403 *Bos indicus* é mais resistente ao estresse oxidativo, conforme observado pela menor
404 produção de espécies reativas de oxigênio pelos espermatozoides e melhor status
405 antioxidantes [42], portanto, essa característica do sêmen pode ter contribuído para o
406 resultado observado.

407 Ademais, as taxas de clivagem de doadoras Girolando e de embriões produzidos
408 de doadoras Gir, no inverno, foram reduzidas pela utilização de sêmen de touros do
409 mesmo grupamento genético da doadora, sugerindo efeito da raça do touro utilizado na
410 fertilização. Alguns relatos da literatura podem explicar, em partes, as diferenças na taxa
411 de clivagem e de produção de embriões observadas neste estudo. Em estudo realizado
412 por Pergorer e outros [43], observou-se maior taxa de concepção na inseminação de
413 vacas Holandesas com sêmen de touro Gir, quando comparado a inseminação com
414 sêmen de touro Holandês, no verão em região tropical. Residiwati e outros [44]
415 observaram benefícios da heterose em indivíduos *Bos taurus* e *Bos indicus* nas taxas de
416 clivagem e blastocistos in vitro. Em contrapartida, outro estudo realizado por Lacerda e
417 outros [8] observaram que o uso do sêmen de touros Holandês com oócitos de vacas
418 mestiças (1/2 Holandês x Gir) resultou em maior produção de embriões quando
419 comparado a fertilização com sêmen de touro Gir. Diante disso, uma possível explicação
420 para estes resultados é a contribuição da heterose no acasalamento entre doadoras *Bos*
421 *taurus* com touros *Bos indicus*, resultando em maior capacidade de desenvolvimento
422 embrionário.

423 Por fim, as demais diferenças encontradas em nosso estudo nas taxas de
424 clivagem e de embriões produzidos de doadoras Holandês, Gir e Girolando podem estar
425 intimamente associadas aos diferentes touros utilizados na FIV, visto que, a quantidade
426 de touros utilizados neste programa de escala comercial é vasta, e não se tem o mesmo

427 touro sendo avaliado em todas as estações do ano para a mesma raça de doadora. De
428 acordo com Adona e outros [45] variações na taxa de fertilidade de touros *in vivo e in*
429 *vitro* são comuns, ou seja, há uma variabilidade individual entre touros, independente
430 do seu grupo racial, o que também foi observado em nosso estudo. Os fatores que
431 interferem na fertilidade dos touros são muitos [46], todavia, variações na taxa de
432 clivagem e de blastocistos com a utilização de diferentes touros na FIV, em sua maioria,
433 estão relacionadas a variabilidade na qualidade espermática [19]. Contudo, também
434 pode estar associado a menor resistência do sêmen de alguns touros aos processos de
435 congelamento e descongelamento [47]. Ademais, os espermatozoides podem diferir em
436 relação a expressão de RNA [48], integridade de DNA [49] e ao perfil de atividade
437 mitocondrial [47], afetando, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário.
438 Portanto, este estudo nos traz novos aspectos importantes relacionados a contribuição
439 do touro utilizado na FIV, e suscita a necessidade da realização de mais estudos sobre
440 este tema.

441 **5. Conclusão**

442 Em síntese, pôde-se perceber que a raça da doadora influencia no número total de
443 oócitos e de oócitos viáveis fornecidos por sessão de OPU. A raça da doadora juntamente
444 com a estação do ano influencia a qualidade dos oócitos coletados, uma vez que
445 doadoras Holandês forneceram mais oócitos viáveis no inverno. A contribuição do touro
446 não deve ser descartada, não somente pela contribuição da raça do touro escolhido, mas
447 pela variabilidade e desempenho de cada touro utilizado na fertilização.

448 **Agradecimentos**

449 Os autores agradecem à Agroopegen pela disponibilização do banco de dados, ao
450 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela
451 concessão da bolsa de estudos e à Universidade Federal de Lavras.

453 **Referências**

454 [1] Negri R, Daltro D, Klusa S, Otto PI, Machado MA, Panetto CJC, Silva MVGB.
455 Genomic-enhanced breeding values for heat stress tolerance in Girolando cattle in
456 Brazil. *Livestock Science* 2023; 105360.

457 [2] Berman A, Foman Y, Kaim M, Manen, Herz Z, Wolfenson D, Arieli A, Graber. Upper
458 critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a
459 subtropical climate. *Journal Dairy Science* 1985; 68:1488–1495.

460 [3] Strigfellow DA, Seidel SM. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de
461 Embriões. IETS 1998; p. 112-113, Illinois.

462 [4] Johnson LA. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y
463 chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility
464 and Development* 1995; n. 4, p. 893-903.

465 [5] Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X
466 and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999; 52(8), 1323-1341.

467 [6] Pontes JHF, Nonato JI, Sanches BV, Ereno JC, Uvo S, Barreiro TRR, Seneda MM.
468 Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods
469 in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009; 71(4), 690-697.

470 [7] Brogliatti GM, Adams GP. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in
471 prepubertal calves. *Theriogenology* 1996; 45, p.1163 – 1176.

472 [8] Salamone DF, Damiani P, Fissori RA, Robl JM, Duby RT. Biochemical and
473 developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is
474 compromised. *Biology of Reproduction* 2001; 64(6), 1761-1768.

475 [9] Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagtina I, Lazzari G.
476 Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59, p. 599 – 616.

477 [10] Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte
478 retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem
479 cows. *Theriogenology* 1994; 41(1), 67-72.

480 [11] Lacerda IP, Dode MAN, Lima MMS, Guerra BF, Costa ES, Moreira GR, Oliveira
481 CJ. Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program
482 on dairy farms. *Livestock Science* 2020; 240, 104135.

483 [12] Hansen, PJ. Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy
484 outcomes in mammals. *Annual Review of Animal Biosciences* 2020; 8, p.395-413.

485 [13] Wondim D, Zidane M, Hoelker M, Gebremedhn S, Poirier M, Pandey HO, Thoelen
486 E, Neuhoff C, Held E, BesenfelderU, HAVLICEK V. Genome-wide DNA methylation
487 patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture
488 before, during or after embryonic genome activation. BMC genomics 2018;
489 Dec;19(1):1-9.

490 [14] Ealy, AD, Wooldridge, Lydia K, Mccoski SR. Board Invited Review: Post-transfer
491 consequences of in vitro-produced embryos in cattle. Journal of animal Science 2019;
492 v. 97, n. 6, p. 2555-2568.

493 [15] Rizos D, Clement M, Bermejo AP, Fuente J, Lonergan P, Gutierrez
494 A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and
495 quality. Reproduction in Domestic Animals 2008; 43, 44-50.

496 [16] Alvarez BP, Lonergan P, Rath D, Adan GA, Rizos D. Developmental kinetics and
497 gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted
498 spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development 2010; 22(2), 426-436.

499 [17] Merton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal, Vos PLAM, Dieleman SJ.
500 Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo
501 technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 2003; 59(2), 651-674.

502 [18] Torres M, Casana TE, Salvado SJ, Blanch C. Nutritional composition and fatty
503 acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and
504 processing conditions. Food Chemistry 2015, 166, 125-132.

505 [19] Watanabe YF, Souza DAH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A,
506 Baruselli PS. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship
507 with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. Animal
508 Reproduction 2017; 14(3), 635-644.

509 [20] Macedo GG, Costa SEV, Pinho RO, Assumpção TI, Jaconini JO, Santos RM,
510 Martins LF. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o
511 desenvolvimento oocitário e o embrionário. Rev Bras Reprod Anim.2014, 38(2), 80-85.

512 [22] Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. Relationship between follicle
513 population, AMH concentration and fertility in cattle. Animal Reproduction
514 2018; 12(3), 487-497.

- 515 [23] Viana JHM, Almeida CLS, Ferreira MA, Sa, DWF, Fernandes CCA, Junior ADPM.
516 Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte
517 quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos*
518 *indicus*) of cattle. *Animal reproduction Science* 2004, 84(1-2), 1-12.
- 519 [24] Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. Relationship between follicle
520 population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*
521 2018; 12(3), 487-497.
- 522 [25] Morotti F, Gonzalez MS, Ceretti MB, Seneda MM. Evaluation of three
523 classification methods of antral follicle count and fertility to the timed artificial
524 insemination in cattle. *Animal Reproduction* 2022, p.19.
- 525 [26] Sartori R, Gimenes LU, Monteiro JPL, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR.
526 Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that
527 impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* 2016; 86(1), 32-
528 40.
- 529 [27] Sudano MJ, Caixeta ES, Paschoal DM, Martins A. Cryotolerance and global gene-
530 expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-
531 produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development* 2014; 26, n. 8, p. 1129-
532 1141.
- 533 [28] Baldrighi J, Sá MFD, Batista EDO, Lopes R. Anti-Mullerian Hormone
534 Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to
535 Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reproduction in domestic*
536 *animals* 2014; 49, n. 6, p. 1015-1020.
- 537 [29] Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CRL, Trinca LA. Influence of the breed of
538 bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*,
539 *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal*
540 *Reproduction Science* 2009, 114, n. 1, p. 54-61.
- 541 [30] Lopes PF, Chase C, Katanani AY, Kringer C. Genetic divergence in cellular
542 resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate
543 versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues
544 and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003; 125, n. 2, p.
545 285-294.

- 546 [31] Lopez GF, Hunter RHF. Local cooling of the ovary and its implications for heat
547 stress effects on reproduction. *Theriogenology* 2020; 149, 98-103.
- 548 [32] Mcamillan KL, Burke CR. Effects of oestrous cycle control on reproductive
549 efficiency. *Animal Reproduction Science* 1996, 42(1-4), 307-320.
- 550 [33] Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D. Embryo development in dairy
551 cattle. *Theriogenology* 2016, 86(1), 270-277.
- 552 [34] Garnsworthy PC, Nashta FAA, Mann GE, Sinclair KD, Webb R. Effect of dietary-
553 induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period
554 on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction* 2009; 137: 759–768.
- 555 [35] Sudano MJ, Caixeta ES, Paschoal DM, Martins A. Cryotolerance and global gene-
556 expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-
557 produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development* 2014; 26, n. 8, p. 1129-
558 1141.
- 559 [36] Shull GH. What is "heterosis"? *Genetics* 1948, 33(5), 439.
- 560 [37] Pontes JHF, Melo FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP. Ovum
561 pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial
562 program using nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2010. 75(9):1640–
563 1646.
- 564 [38] Berman, A., Y. Folman, M. Kaim, M. Mamen, Z. Herz, D. Wolfenson, A. Arieli,
565 Graber. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy
566 cows in a subtropical climate. *Journal Dairy Science*. 68:1488–1495, 1985.
- 567 [39] Lopes, F. F. D. P., Lima, R. S., Risolia, P. H. B., Ispada, J., Assumpção, M. E. O.,
568 Visintin J. A. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular
569 aspects. *Animal reproduction*, 395-403, 2012.
- 570 [40] Çizmecci, S. Ü., Dinc, D. A., Yesilkava, O. F., Ciftci, M. F., Takci, A., Bucak, M. N.
571 Effects of heat-stress on oocyte number and quality and in vitro embryo production in
572 Holstein heifers. *Acta Scientiae Veterinariae*, 50, 2022.
- 573 [41] LEE, J., KIM, D., SON, J., KIM, D., JEON, E., JUNG, D., CHOI, I. Effects of heat
574 stress on conception in Holstein and Jersey cattle and oocyte maturation in
575 vitro. *Journal of Animal Science and Technology*, 65(2), 324, 2023.

576 [42] Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, Cortada,
577 CNM. Variação sazonal na qualidade do sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus*
578 criados em condições tropicais. *Teriogenologia* 2006; 66 (4), 822-828.

579 [43] Pegorer MF, Vasconcelos JL, Trinca LA., Hansen PJ, Barros CM. Influence of sire
580 and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss
581 in lactating Holstein cows during summer heat stress. *Theriogenology*, 2007; 67(4),
582 692-697.

583 [44] Residiwati, G., Tuska, H. S., Dolatabad, N. A., Sidi, S., Van Damme, P., Pavani, K.
584 C., ... & Van Soom, A. (2020). Crossbreeding effect of double-muscled cattle on in vitro
585 embryo development and quality. *Reproductive Biology*, 20(3), 288-292.

586 [45] Adona, P. R.S., Y. L., Miranda .S., M., Rodrigues, I., Guemra, S., Ferreira, M. B.
587 Fertility analysis of bovine semen by in vitro fertilization. *Tropical Animal Health and*
588 *Production*, 54(2), 137, 2022.

589 [46] Bollwein, H. e Malama, E. (2023). Avaliação da fertilidade de touros. Abordagens
590 funcionais e moleculares. *animal* , 17 , 100795.

591 [47] Leite, RF, de Agostini Losano, JD, Kawai, GKV, Rui, BR, Nagai, KK, Castiglioni,
592 VC, Nichi, M. Função espermática e estado oxidativo: Efeito sobre a fertilidade em
593 touros *Bos taurus* e *Bos indicus* quando o sêmen é usado para inseminação artificial em
594 tempo fixo. *Ciência da Reprodução Animal*, 2022; 237, 106922.

595 [48] Turri, F., Capra, E., Lazzari, B., Cremonesi, P., Stella, A., & Pizzi, F. (2021). Uma
596 análise combinada de citometria de fluxo de sêmen e perfil de miRNA como uma
597 ferramenta para discriminar entre touros de alta e baixa fertilidade. *Fronteiras na*
598 *Ciência Veterinária* , 8 , 703101.

599 [49] Talluri, TR, Kumaresan, A., Sinha, MK, Paul, N., Ebenezer Samuel King, JP, &
600 Datta, TK (2022). Análises multiômicas integradas revelam que moléculas que
601 governam o metabolismo dos espermatozoides influenciam potencialmente a fertilidade
602 dos touros. *Relatórios Científicos* , 12 (1), 10692.

603