



## Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões *in vitro* (PIVE)

*Factors associated to the donor influencing the production of embryos in vitro (PIVE)*

Raquel Rodrigues Costa Mello<sup>1,4</sup>, Joaquim Esquerdo Ferreira<sup>1</sup>, Sabrina Luzia Grégio de Sousa<sup>2</sup>, Marco Roberto Bourg de Mello<sup>1</sup>, Helcimar Barbosa Palhano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

<sup>4</sup>Correspondência: raquelmello@ufrj.br

### Resumo

A produtividade dos rebanhos bovinos, seja de corte ou de leite, tem sido ampliada consideravelmente através do aperfeiçoamento das biotécnicas de manejo reprodutivo. Entre estas, a produção *in vitro* (PIVE) de embriões tem sido utilizada com o objetivo de se produzir um maior número de descendentes por fêmea doadora, aumentando a vida útil desta. No entanto, apesar dos enormes avanços nos últimos anos, esta biotécnica ainda apresenta grandes limitações, pois diversos fatores podem interferir nos resultados finais, tornando viável ou não sua implementação a nível comercial. O objetivo deste trabalho de revisão é apontar algumas fontes de variação ligadas à doadora na produção *in vitro* de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** doadora, estação do ano, OPU.

### Abstract

*Productivity of livestock cattle, either beef or milk, has been expanded greatly through the improving of reproductive biotechnologies. Among these, in vitro production (EIVP) of embryos have been used in order to generate a larger number of offspring per female, extending the life cycle of them. However, despite the greater advances in most recent years, this biotech still has major limitations, because many factors may interfere on the final results, making feasible or not their implementation on a commercial level. The aim of this review is highlight some sources of variation for in vitro production of embryos in cattle.*

**Keywords:** donor, season of the year, OPU.

### Introdução

A atual e crescente necessidade de incremento da produtividade pecuária tem conduzido a aplicação de várias biotécnicas de manejo reprodutivo, principalmente quanto à espécie bovina, que apresenta um baixo número de descendentes e longo intervalo de gerações. Neste sentido, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta que vem sendo largamente utilizada no Brasil, proporcionando um aumento na possibilidade de multiplicação do material genético obtido de fêmeas bovinas, contribuindo de forma decisiva para melhorar a qualidade e a quantidade do produto final, seja este carne ou leite (Mocé et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Silva et al., 2015). O principal objetivo da PIVE consiste na obtenção de um maior número de descendentes, e vem demonstrado maiores vantagens em relação à transferência de embriões *in vivo* (TE) por apresentar maior flexibilidade, dispensando a utilização de tratamentos hormonais para a recuperação dos oócitos. Além disso, a fertilização *in vitro* de oócitos recuperados permite a utilização de touros diferentes para doadoras individuais, assim como viabiliza a utilização do sêmen sexado, permitindo sua utilização em escala comercial (Rath e Johnson, 2008; Varago et al., 2008; Mello et al., 2016). No entanto, existem diversos fatores que podem interferir nos resultados na PIV de embriões bovinos, como os relacionados à própria doadora, tais como genótipo, idade, peso, categoria animal, estágio do ciclo estral, condição fisiológica e nutrição, relacionados ao clima, tais como foto período, temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, relacionados aos procedimentos da PIV, tais como os diferentes meios utilizados para a maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, e relacionados à receptora (Peixoto et al., 2006; Andrade et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Mello et al., 2016). Portanto, os objetivos da presente revisão é relatar alguns fatores ligados à doadora que podem interferir na eficiência de um programa de produção *in vitro* de embriões (PIVE).

### Fatores que influenciam a produção *in vitro* de embriões

#### *Genótipo da doadora*

De acordo com diversos trabalhos na literatura, fêmeas *Bos taurus indicus* recrutam maior número de



foliculos por onda de crescimento folicular e possuem maior população de foliculos menores que 5 mm em comparação às fêmeas *Bos taurus taurus* (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Pontes et al., 2009). Grázia et al. (2012) sugeriram que a maior população de foliculos que emergem em cada onda de crescimento folicular em *Bos taurus indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-1, que mesmo na presença de baixos níveis de FSH, pode promover maior mobilização e crescimento folicular nesses animais. Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de OPU-PIV, indicando vantagem de fêmeas zebuínas em relação às taurinas (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2007; Silva et al., 2015).

Outro fator a ser relacionado são as concentrações do hormônio anti-mulleriano (AMH), que tem como uma das suas funções promover uma redução na expressão do mRNA no receptor de FSH, exercendo um feedback negativo no desenvolvimento folicular e na proliferação das células da granulosa (Pellatt et al., 2011). As concentrações plasmáticas de AMH têm sido utilizadas como um marcador da reserva folicular ovariana em bovinos, pois o mesmo apresenta um padrão de expressão (foliculos pré-antrais e pequenos foliculos antrais) (Rico et al., 2011).

Em estudo realizado por Rico et al. (2012), os autores observaram que com apenas uma amostra de sangue coletada vários meses antes da OPU ou tratamento superestimulatório, foi possível a determinação da concentração plasmática de AMH, podendo, assim, selecionar animais que responderam melhor a essas biotecnologias.

Desse modo, tem sido observada grande variação na eficiência da coleta dos complexos *cumulus-oócito* (CCOs) e subsequente produção de embriões *in vitro* entre os diferentes genótipos e raças de bovinos (Lopes et al., 2006; Baruselli et al., 2007; Hirata et al., 2008; Silva et al., 2015). Algumas diferenças relatadas entre os genótipos foram associadas ao número e qualidade dos CCOs recuperados por sessão de aspiração, sendo que fêmeas zebuínas podem ter maior número de oócitos recuperados e, conseqüentemente, maior número de CCOs aptos ao cultivo para passarem pelas etapas de maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro* (Pontes et al., 2009; Viana et al., 2010; Ratto et al., 2011; Satrapa et al., 2011; Silva et al., 2015).

#### *Categoria da doadora*

O aumento do mérito genético, associado às mudanças no manejo nutricional levando ao baixo escore de condição corporal e alta produção de leite têm efeitos deletérios sobre a produção e a qualidade de oócitos e embriões (Rizos et al., 2005; Grimard et al., 2013). Os experimentos que investigam as relações entre produção de oócitos e fertilidade têm levado em consideração também a parição, ou seja, a diferença entre as categorias primíparas e múltiparas. A taxa de concepção à primeira IA é mais alta após a primeira parição quando comparado à parições sucessivas, e as concentrações plasmáticas pós-parto de IGF-1 e NEFA são mais altas em vacas primíparas do que vacas múltiparas, sendo que a parição exerce influência na qualidade dos oócitos e na sua capacidade para se desenvolver *in vitro* (Walters et al., 2002; Taylor et al., 2004; Lopez et al., 2005; Grimard et al., 2006; Barbat et al., 2010). Os trabalhos na literatura associam as mudanças relacionadas ao número de parições à população e a qualidade dos oócitos e embriões produzidos *in vitro*, pressupondo-se diferenças na produção de oócitos e embriões entre novilhas, primíparas e múltiparas (Sartori et al., 2002; Meikle et al., 2004; Wathes et al., 2007; Grimard et al., 2013). Swangchan-Uthai et al. (2011), observaram que o oviduto de uma novilha no momento do estro e no início da fase lútea é exposto a alta concentração de IGF-I, em contraste, uma vaca em lactação tem menor circulação IGF-I e reduzida expressão de proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina no oviduto (IGFBP). Sartori et al. (2002) observaram maior número de embriões recuperados de novilhas do que de vacas, sendo que também novilhas tiveram uma maior porcentagem de embriões viáveis do que vacas ( $P < 0,05$ ). Walters et al. (2002) encontraram maior número de foliculos em vacas de segunda parição até 85 dias pós-parto, onde o número de foliculos foram medidos repetidamente nas mesmas vacas, sugerindo que o recrutamento e o crescimento dos foliculos aumentaram conforme o número de dias no período pós-parto. Os autores também verificaram que o número de foliculos e os oócitos recuperados em vacas de terceira parição diminuíram conforme a lactação avançou em estágio. Ainda nesse mesmo estudo, as primíparas tiveram maiores concentrações de NEFA do que as múltiparas, provavelmente relacionado às mudanças no escore de condição corporal, o que pode refletir na capacidade de produção de oócitos e embriões. Do mesmo modo, Nogueira et al. (2012) realizaram um estudo com a suplementação de AGPs em novilhas da raça Nelore e observaram aumento no número de oócitos recuperados dessas novilhas.

#### *Idade da doadora*

De acordo com alguns autores, tem sido observado um declínio na contagem dos foliculos antrais durante as ondas de crescimento folicular, resposta ovariana aos tratamentos superestimulatórios reduzida, menor recuperação dos oócitos e conseqüentemente menor produção embrionária em fêmeas mais velhas em relação as mais jovens. Da mesma forma, fêmeas mais velhas tendem a ter um menor número de foliculos após superestimulação ovariana com gonadotrofinas, apresentando mudanças no perfil hormonal e tamanho folicular em comparação com as fêmeas mais jovens (Malhi et al., 2005; Rizos et al., 2005; Malhi et al., 2006; Su et al.,



2012; Ferreira et al., 2014).

O início da queda da eficiência reprodutiva é caracterizado por mudanças no perfil hormonal, detectadas por alterações na dinâmica folicular ovariana (Ferreira, 2011). Desse modo, observa-se que altas concentrações plasmáticas de FSH e LH aumentam o estímulo ao desenvolvimento folicular, causando perda acelerada dos folículos. Assim, essas mudanças se refletem na baixa qualidade e capacidade dos folículos velhos em produzir concentrações adequadas de inibina, que exerceria efeito de retroalimentação negativa na secreção de FSH. Desse modo, sem a ação ou com a baixa atividade da inibina, as vacas mais velhas teriam maiores concentrações plasmáticas de FSH, o que causaria uma aceleração no processo de foliculogênese (Caetano et al., 1997; Flaws et al., 1997; Packer et al., 1998; Malhi et al., 2008).

Desse modo, relatos na literatura associando oócitos de qualidade inferior com animais mais velhos são bastante frequentes (Dayan, 2001; Rizos et al., 2005; Peixoto et al., 2006; Malhi et al., 2008). Mermillod et al. (1992), ao avaliarem os efeitos da idade na produção de blastocistos *in vitro*, observaram maior produção de embriões em animais entre 1 e 3 anos de idade do que em animais mais velhos. De acordo com Su et al. (2012), animais mais velhos produzem menor número de oócitos e com baixo percentual de desenvolvimento, além da baixa qualidade devido ao menor número de camadas de células do *cumulus*, gerando oócitos com menor capacidade de desenvolvimento.

#### *Ciclo estral da doadora*

A fêmea bovina é classificada como poliéstrica anual, tendo o ciclo estral duração de aproximadamente 21 dias, variando entre 18 e 24 dias. O ciclo estral bovino pode ser dividido didaticamente em quatro fases, de acordo com a ocorrência de eventos fisiológicos e endócrinos sendo, estro, metaestro, diestro e proestro (Caetano e Caetano Jr., 2015).

O estágio do ciclo estral no momento da OPU influencia as taxas de recuperação e a qualidade oocitária em programas PIV (Merton et al. 2003; Vassena et al. 2003; Hendriksen et al. 2004). Contudo, devido aos resultados inconsistentes, a fase folicular ideal para maximizar a performance da OPU ainda permanece desconhecida. Têm sido relatadas melhores taxas de recuperação quando a OPU é realizada próximo a emergência folicular, sendo também descritas melhores capacidades de desenvolvimento da competência *in vitro* quando oócitos são obtidos durante a fase precoce de dominância folicular (Merton et al. 2003; Hendriksen et al. 2004; Machatková et al. 2004).

A aquisição da competência oocitária é adquirida gradualmente e aumenta com o desenvolvimento folicular. Sabe-se que esta competência está relacionada ao tamanho do folículo, estágio do ciclo estral e nível de atresia influenciado pelo folículo dominante, sendo que aqueles podem adquirir a capacidade de competência se os folículos precedentes alcançarem 7 mm em tamanho (Pavlock et al., 1992). Além desses aspectos, têm sido observadas diferenças na competência durante o ciclo estral em termos de presença ou ausência de um folículo, independente do tamanho do folículo, sendo que o desenvolvimento ao estágio de blastocisto foi melhor quando os oócitos foram obtidos durante a fase de crescimento em comparação com a fase de dominância (Hagemann, 1999; Machatková et al., 2004; Ferreira, 2011).

#### *Nutrição da doadora*

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução, a nutrição tem um papel importante por afetar diretamente aspectos do metabolismo, fisiologia e desempenho reprodutivo na fêmea bovina (Beam e Butler, 1997; Sinclair et al., 2002; Diskin et al., 2003; Gottschall et al., 2012; Torres et al., 2015). Na literatura, vários estudos associam o excesso ou falta de nutrição à redução da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causas determinantes o balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela diminuição do escore da condição corporal no pós-parto e pela própria condição corporal ao parto (Moreira et al., 2000; López-Gatius et al., 2002; Chagas et al., 2007; Ferreira, 2011).

A nutrição influencia a função reprodutiva em bovinos sobre muitos aspectos, entre as quais a produção e a qualidade de oócitos e embriões produzidos *in vitro* em animais superestimulados e não-superestimulados, sendo que efeitos deletérios do elevado consumo de energia ou ingestão de matéria seca (MS) no desenvolvimento e qualidade embrionária são evidentes nesses animais (Nolan et al., 1999; Boland et al., 2001; Sales et al., 2015). O aumento da ingestão de MS causa aumento do fluxo sanguíneo para o fígado, onde há grande metabolização dos hormônios esteróides progesterona e estradiol. Portanto, quanto maior a ingestão de MS, menores concentrações sanguíneas desses hormônios são observadas (Sangsrítavong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003).

Sales et al. (2015) mostraram que animais *Bos taurus indicus* que receberam uma dieta de alta energia por um tempo prolongado teve a produção de embriões *in vitro* afetada comparada com animais que receberam uma dieta de manutenção. Ainda neste estudo notou-se que os oócitos de doadoras *Bos taurus taurus* sofriam menos influência da dieta com alta quantidade de energia. Dietas têm sido testadas a fim de tentar melhorar a eficiência na produção *in vitro* de embriões. Como mostrado por Domingues et al. (2014), que observaram uma



diferença significativa na taxa de eclosão dos embriões vitrificados dos animais que não receberam a dieta com canola sendo menor quando comparados aos animais que receberam a dieta com canola.

#### Sanidade

A cada nova biotecnologia que surge na área de reprodução animal, observa-se um crescente interesse no controle da transmissão de doenças infecciosas. Do ponto de vista epidemiológico, os novos ambientes favoráveis ao crescimento de microorganismos e a manipulação excessiva do material, possibilitam a contaminação e disseminação de patógenos (Stringfellow et al., 2004).

A maioria dos sistemas usados para produção de embriões *in vitro* requer meios complexos com algum tipo de soro ou células de suporte, que provêm um ambiente favorável para o desenvolvimento embrionário, mas podendo permitir facilmente a introdução e manutenção de micro-organismos no sistema (D'Angelo et al., 2003). Doenças infecciosas como a brucelose, leptospirose, campilobacteriose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e tricomoníase afetam diretamente a reprodução animal (Eaglesome et al., 1992).

É importante e necessário o aprimoramento contínuo de métodos de controle sanitário do rebanho e das biotécnicas ligadas à reprodução, uma vez que as mortalidades embrionária e fetal têm um grande impacto na rentabilidade de qualquer sistema de produção animal (Magajevski, 2007).

#### Sazonalidade

Os principais efeitos da sazonalidade na produção e desenvolvimento de embriões *in vitro* referem-se tanto aos parâmetros climáticos quanto aos nutricionais. Estes efeitos são especificamente relativos à disponibilidade e qualidade dos alimentos, ocorrendo principalmente em sistemas de produção onde os animais são manejados a pasto, como é comumente observado na maior parte do território brasileiro (Fernandes et al., 2001; Márquez et al., 2005; Gama Filho et al., 2007; Dourado et al., 2012; Ferreira et al., 2014). A qualidade oocitária é dependente da sazonalidade, em virtude das alterações celulares como diminuição da maturação nuclear, desorganização do citoesqueleto e apoptose, serem oriundas de períodos em que o animal encontrava-se em hipertermia (Lima, 2012).

Dourado et al. (2012) realizaram um estudo para avaliar o efeito da sazonalidade em vacas da raça Gir e observaram que o número de embriões produzidos *in vivo* em vacas da raça Gir superovuladas não foi afetado pelo clima de verão e inverno sob condições tropicais, o percentual de oócitos fecundados *in vivo* (SOV) em vacas da raça Gir superovuladas foi maior no verão e o percentual de embriões degenerados em vacas da raça Gir superovuladas foi menor no inverno.

Tribulo et al. (1991) realizaram um estudo para se avaliar o efeito da sazonalidade em vacas da raça Brahman mantidas a pasto, e observaram que as fêmeas produziram maior número de estruturas totais e fecundadas em coletas realizadas nos meses do verão quando comparadas com aquelas realizadas nos meses do inverno, sendo verificado, nesta estação do ano, menor número de oócitos viáveis e embriões por coleta. Do mesmo modo, em um trabalho realizado por Rubin et al. (2005) em doadoras da raça Nelore, os autores relataram que as fêmeas produziram maior proporção de oócitos viáveis na época da primavera e verão quando comparado com a época do outono e inverno.

Rocha et al. (1998), ao avaliarem fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* submetidas a OPU durante o verão e inverno, observaram que *Bos taurus* apresentaram menor porcentagem de oócitos normais durante o verão em relação ao inverno, sendo que nenhum embrião chegou ao estágio de mórula ou blastocisto. No entanto, para *Bos indicus*, não foi visto diferença na porcentagem de oócitos normais ou no desenvolvimento embrionário entre as estações do ano, concluindo que a alta temperatura e umidade ambiental durante o período do verão resultaram em declínio na qualidade embrionária em *Bos taurus*, não se observando o mesmo efeito em *Bos indicus*.

### Considerações Finais

A produção *in vitro* de embriões (PIV) vem demonstrando grandes avanços em termos de procedimentos teóricos e práticos, o que tem permitido aumentos na sua eficiência. O conhecimento dos diversos fatores que influenciam na PIV é de grande importância para se melhorar os índices finais, seja em laboratório ou a campo. Mais estudos são necessários para se compreender melhor o efeito dos diversos fatores ligados à doadora na PIV de embriões bovinos.

### Referências

- Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Pereira Júnior MV, Oliveira AJ, Nunes DP, Bonato GL, Santos RM. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Rev Bras Reprod Anim, v.36, p.66-69, 2012.
- Barbat A, Le Mezec P, Ducrocq V, Mattalia S, Fritz S, Boichard D, Ponsart C, Humblot P. Female fertility



- in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. *J Reprod Devel*, v.56, p.15-21, 2010.
- Baruselli PS, Gimenes LU, Sales JS.** Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.205-211, 2007.
- Beam SW, Butler WR.** Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Bio Reprod*, v.56, p.133-142, 1997.
- Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF.** Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.307-326, 2003.
- Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D.** Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, v.55, p.1323-1340, 2001.
- Caetano e Caetano Jr.** Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas. *PubVet*, v.9, p. 381-393, 2015.
- Caetano JPJ, Faria MML, Lima RSBC.** Ginecologia e obstetrícia: manual prático. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997, 726 p.
- Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS.** Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.167-175, 2008.
- Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin CB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R.** Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*, v.90, p.4022-4032, 2007.
- D'angelo M, Silva SACM, Senedezi MLP, Gonçalves RF, Galuppo AG, Barra SHC, Melo GM, Zerio NMC.** Morphological evaluation of mice zygotes experimentally infected by *Brucella abortus*. *Bio Reprod*, v.68, p.163, 2003.
- Dayan A, Watanabe MR, Watanabe YF.** Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arq Vet UFRGS*, v.28, p.181-185, 2000.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM.** Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.345-370, 2003.
- Domingues MCN, Rigolon LP, Cavalieri FLB, Seko MB, Albuquerque K, Zancheta CG.** Viabilidade de embriões vitrificados oriundos da fertilização *in vitro* de oócitos de vacas suplementadas com canola. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.66, p.145-151, 2014.
- Dourado AP, Torres Filho RA, Cardoso EC, Sinedino LD, Gerhardt BT, Goulard IL, Nogueira LAG.** Produção estacional de embriões *in vivo* em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) na região sudeste (clima tropical), Brasil. *Rev Bras Vet*, v.19, p.183-189, 2012.
- Eaglesome MD, Garcia MM, Stewart RB.** Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Chlamydia* spp., pathogens and semen contaminants. Treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Vet Bulletin*, v.62, p.887-910, 1992.
- Fernandes CE, Dode MAN, Godoy K, Rodovalho N.** Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. *Braz J vet Res Anim Sci*, v.38, p.131-135, 2001.
- Ferreira MBD, Lopes BC, Souza JC, Pinto TLC, Lima MR, Lemos FO, Fernandes LO, Garcia JM.** Produção *in vitro* de embriões e prenhez de doadoras da raça Gir (*Bos Taurus indicus*): influência da idade da vaca e do touro. *Anim Reprod*, v.11, p.273, 2014.
- Ferreira MBD.** Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*). Jaboticabal: 2011. 176f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2011.
- Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN.** Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *BioReprod*, v.57, p.1233-1237, 1997.
- Gama Filho RV, Fonseca FA, Ueno VG, Fontes RS, Quirino CR, Ramos JLG.** Sazonalidade na dinâmica folicular ovariana e produção embrionária em novilhas da raça Guzerá. *Braz J vet Res Anim Sci*, v.44, p.422-427, 2007.
- Gonçalves PBD, Barreta MB, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- Gottschall CS, Ferreira ET, Márquez P, Galarza AA, Tanure S, Lourenzen G, Bittencourt HR.** Influências das relações entre o ganho médio diário de peso, a idade e o peso no primeiro acasalamento no desempenho reprodutivo de novilhas de corte acasaladas aos 14 e 24 meses. *Ceres*, v.53, p.307, 2015.
- Grázia JGV, Ghetti AM, Paim CAS, Arashiro EKN, Camargo LSA, Garcia RMG, Viana JHM.** Associação da concentração de IGF plasmático e produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Gir. *Anim Reprod*, v.9, p.404, 2012. (Resumo).
- Grimard B, Freret S, Chevallier A, Pinto A, Ponsart C, Humblot P.** Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.31-44, 2006.
- Grimard B, Marquant-leguienne B, Remy D, Richard C, Nuttinck F, Humblot P, Pontier AA.** Postpartum variations of plasma IGF and IGFBPs, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and



- subsequent fertility. *Reprod Dom Anim*, v.48, p.183-194, 2013.
- Hagemann LJ.** Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, v.51, p.449-459, 1999.
- Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ.** Effect of different stages of follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.909-920, 2004.
- Hirata TI, Sato M, Sasaki AI, Sasaki O, Osawa T.** Effect of suckling on embryo production by repeated ovum pick-up before and after timed artificial insemination in early postpartum Japanese black cows. *J Reprod Devel*, v.54, p.351-364, 2008.
- Lima RS.** O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. 2012. Botucatu: 138p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), UNESP, Botucatu-SP, 2012.
- Lopes AS, Martinussen T, Greve T, Callesen H.** Effect of day's post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod Dom Anim*, v.41, p.196-203, 2006.
- Lopez H, Sartori R, Wiltbank MC.** Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Bio Reprod*, v.72, p.788-795, 2005.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J.** Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology*, v.57, p.1251-1261, 2002.
- Machatková M, Krausová K, Jokesová E, Tomanek M.** Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and phase follicular wave on embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329-335, 2004.
- Magajewski FS, Girio RSJ, Meirelles RB.** Pesquisa de leptospira em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. *Arq Instituto Biológico*, v.74, p.67-72, 2007.
- Malhi PS, Adams GP, Mapletoff RJ, Singh J.** Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Anim Reprod Sci*, v.109, p.100-109, 2008.
- Malhi PS, Adams GP, Pierson RA, Singh J.** Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, v.66, p.1257-1266, 2006.
- Malhi PS, Adams GP, Singh J.** Bovine model for the study of reproductive aging in women follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Bio Reprod*, v.73, p.45-53, 2005.
- Márquez YC, Galina CS, Moreno NTI.** Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod Dom Anim*, v.40, p.553-558, 2005.
- Meikle A, Kulscar M, Chilliard Y, Febel H, Delevald C, Cavestany D, Chilbroste P.** Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, v.127, p.727-737, 2004.
- Mello RRC, Morais MEO, Ferreira JE, Mello MRB.** Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. *B Anim Husb*, v.73, p.88-93, 2016.
- Mermillod P, Wils C, Massip A, Dessy F.** Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J Reprod Fertil*, v.96, p.717-723, 1992.
- Merton JS, De Roos AP, Mullaart E, De Ruigh, L, Kaal, L, Vos PL, Dieleman SJ.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-74, 2003.
- Mocé E, Graham JK, Schenk JL.** Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, v.66, p.929-936, 2006.
- Moreira F, Risco C, Pires MF.** Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, v.53, p.1305-1319, 2000.
- Nogueira E, Silva AS, Amaral TB, Ítavo LCV, Dias AM, Mingoti GZ.** Follicular dynamics and production of oocytes in Young Nellore Heifers with energetic supplementation. *Rev Bras Zootec*, v.41, p.2012-2017, 2012.
- Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P, Boland MP.** The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, v.50, p.1263-1274, 1999.
- Packer C, Tatar M, Collins A.** Reproductive cessation in female mammals. *Nature*, v. 392, p.807-811, 1998.
- Pavlock A, Lucans H, Niemann H.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Devel*, v.31, p.63-67, 1992.
- Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Fonseca CG, Penna VM, Pereira CS.** Effect of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.58, p.567-574, 2006.
- Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD.** Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. In: (Ed.). *Fertil Steril*, v.96, p.1246-1251, 2011.
- Pontes JHF, Nonato-Júnior I, Sanches BV, Ereno-Júnior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nellore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-699, 2009.
- Rath D, Johnson LA.** Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod*



Dom Anim, v.43, p.338-346, 2008.

**Ratto MH, Peralta OA, Mogollon G, Strobel P, Correa J.** Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.1-6, 2011.

**Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé J, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D.** Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Devel*, v.24, p.932-944, 2012.

**Rico C, Me Digue C, Fabre S, Jarrir P, Bontoux M, Clement F, Monniaux D.** Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Bio Reprod*, v.84, p.560-571, 2011.

**Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Meeb JF, O'Farrell KJ, Macsiurtain M, Boland MP, Lonergan P.** Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v.63, p.939-949, 2005.

**Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W.** High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v.49, p.657-665, 1998.

**Rubin KCP, Max MC, Pontes JHF.** Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça Nelore. *Acta Sci Vet*, v.33, p.372, 2005. (Resumo).

**Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS.** Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci*, v.98, p.1-14, 2015.

**Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC.** High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.85, p.2831-2842, 2002.

**Sartori R, Sartori-Bergfelt R, Mertens SA.** Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, v.85, p.2803-2812, 2002.

**Satrapa RA, Nabhan T, Silva CF, Simões RAL, Razza EM, Puelker RZ, Trinca LA, Barros CM.** Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.76, p.1162-1167, 2011.

**Silva APTB, Mello RRC, Ferreira JE, Mello MRB.** Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. *B Anim Husbandry*, v.72, p.51-58, 2015.

**Sinclair KD, Revilla R, Roche JF, Quintans G, Sanz A, Mackey DR, Diskin MG.** Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *J Anim Sci*, v.75, p.115-126, 2002.

**Stringfellow DA, Givens MD, Waldrop JG.** Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Devel*, v.16, p.93-102, 2004.

**Su L, Yang S, He X, Li X, Ma J, Wang Y, Presicce GA, Ji W.** Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.184-189, 2012.

**Swangchan-Uthai T, Walsh S, Alexander W, Cheng LH, Crowe MA, Evans ACO, Wathes DC.** Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. *Reproduction*, v.142, p.457-465, 2011.

**Taylor VL, Beever DE, Bryant MJ, Wathes DC.** First lactation ovarian function in dairy heifers in relation to prepubertal metabolic profiles. *J Endocrinol*, v.180, p.63-75, 2004.

**Torres HAL, Tineo JSA, Raidan FSS.** Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte. *Archivos de Zootecnia*, v.65, p.255-260, 2015.

**Tribulo H, Bo GA, Jofre F.** The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.35, p.286, 1991. (Resumo).

**Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.100-109, 2008.

**Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC.** Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, v.60, p.795-807, 2003.

**Vassena R, Mapletoft JR, Allodi S, Singh J, Adams PG.** Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, v.60, p.923-932, 2003.

**Viana JHM, Palhão MP, Siqueira LGB, Fonseca JF, Camargo LSA.** Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gir breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v.73, p.966-972, 2010.

**Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC.** Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality and hormones to 90 days postpartum. *J Dairy Sci*, v.85, p.824-832, 2002.

**Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann CE, Taylor VJ, Coffey MP.** Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci*, v.90, p.1310-1325, 2007.