



## Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos

*Strategies to increase embryo production in cattle*

Pietro Sampaio Baruselli<sup>1,‡</sup>, Flávia M. Elliff<sup>1</sup>, Laísa G. Silva<sup>1</sup>, Bruna L.C. Catussi<sup>1</sup>, Bernardo M. Bayeux<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal, USP, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Bovigênese, Cravinhos, SP, Brasil.

### Resumo

As biotecnologias para produção de embriões *in vivo* e *in vitro* são de grande importância para acelerar o ganho genético dos rebanhos de corte e de leite. No entanto, o sucesso desses processos depende diretamente da quantidade e da qualidade dos oócitos da doadora de embrião. Diversos fatores influenciam a produção de embriões como a população folicular, a idade da doadora, o estresse térmico, o status metabólico e o status reprodutivo. Na atualidade, vários estudos têm sido desenvolvidos para elaborar estratégias que contornem estes desafios e aumentem a eficiência das técnicas de produção de embriões. Dentre os tratamentos estabelecidos para melhorar a produção de embriões das doadoras destacam-se a utilização de FSH, rBST, propilenoglicol e células tronco mesenquimais.

**Palavras-chave:** transferência de embriões, melhoramento genético, receptoras, doadoras, OPU/FIV.

### Abstract

*Biotechnologies for producing in vivo and in vitro embryos are very important to accelerate the genetic gain of beef and dairy herds. However, the success of these processes depend directly on the quantity and quality of the donors oocytes. Many factors influence the embryo production, such as follicle population, age, heat stress, metabolic status and reproductive status. Recently, many studies have been conducted to elaborate strategies that can overcome these issues and increase the efficiency of the embryo production techniques. Among the treatments developed to improve the embryo production, the use of FSH, rBST, propylene glycol and mesenchymal stem cells stand out.*

**Keywords:** embryo transfer, genetic improvement, recipients, donors, OPU/IVF.

### Introdução

Dentre as biotecnologias reprodutivas utilizadas atualmente, a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta de grande importância para incrementar o ganho genético e melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva em rebanhos de leite e de corte. Além disso, ao utilizar tecnologia de transferência de embriões (TE), torna-se possível disseminar material genético de alto valor tanto de machos quanto de fêmeas, enquanto que outras biotecnologias, como a inseminação artificial, permitem a rápida multiplicação de material genético apenas de machos. A TE teve crescimento considerável na última década, principalmente por conta da melhoria nos processos de produção de embriões e do advento da genômica que aumenta a acurácia da seleção de indivíduos geneticamente superiores. Essas tecnologias possibilitam a utilização da TE de forma direcionada e eficiente nos rebanhos de carne e de leite.

No entanto, o sucesso da TE depende da quantidade de folículos e da qualidade dos oócitos (Pontes et al. 2010; Baruselli et al. 2012). Dentre os fatores que podem influenciar a qualidade oocitária, podem-se destacar a idade (Guerreiro et al., 2014a), a categoria (Guerreiro et al., 2014a), o estresse térmico (Ferreira et al., 2011), o status reprodutivo (Bayeux, 2016) e o status metabólico (Sales et al., 2015; Mingoti, 2018) das doadoras. Estudos destacam que a quantidade de folículos presentes nos ovários está correlacionada ao grupo genético da doadora (Carvalho et al., 2008; Pontes et al., 2010; Gimenes et al., 2015). Ainda, há controvérsias quanto ao efeito da nutrição sobre a população folicular. Mossa et al. (2013) relataram que a restrição alimentar durante o primeiro trimestre de gestação pode influenciar negativamente a população folicular de sua prole. No entanto, Batista et al. (2013) afirmam que fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas a desafios nutricionais não tiveram comprometimento de sua população folicular.

Na tentativa de contornar estes fatores que podem interferir negativamente na eficiência da TE, vários grupos de pesquisa têm estudado diversos tratamentos para melhorar a qualidade oocitária de doadoras de embrião, procurando tornar o processo viável em diferentes categorias animais e situações desfavoráveis. A seguir serão discutidas estratégias que buscam aumentar a eficiência da produção de embriões.

<sup>‡</sup>Correspondência: barusell@usp.br

Recebido: 8 de abril de 2019

Aceito: 26 de abril de 2019



## Desafios e estratégias para melhorar a produção *in vivo* de embriões

Diversos estudos comprovaram que oócitos maturados *in vivo* tem maior competência de desenvolvimento quando comparados com oócitos maturados *in vitro* (Greve et al., 1987; Leibfried-Rutledge et al., 1987; MarquantLe Guienne et al., 1989; Bordignon et al., 1997; van de Leemput et al., 1999; Rizos et al., 2002).

Pesquisas foram realizadas a fim de desenvolver protocolos de SOV associados à IATF em várias raças bovinas sincronizadas com dispositivos de P4 e BE (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006). Os protocolos foram elaborados levando em consideração o intervalo entre o primeiro tratamento com PGF $\alpha$  e o momento da remoção da fonte de P4 (por exemplo, P-24 e P-36; Barros et al., 2010, Nogueira et al., 2002). Não houve diferenças significativas no número e qualidade de embriões transferíveis entre os tratamentos P-24 e P-36 (Baruselli et al., 2006). Portanto, ambos os tratamentos podem ser utilizados para superovular vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* com IATF, eliminando a necessidade de detecção de cio da doadora de embrião.

No entanto, devido às diferenças no diâmetro do folículo dominante no momento da divergência e ovulação em vacas Nelore (menor) e Holandesas (maior) (Gimenes et al., 2008, Sartori et al., 2001), verificou-se que o momento apropriado para indução da ovulação pode diferir entre esses grupos genéticos. Portanto, é indicado o tratamento para induzir ovulação com GnRH ou LH 12 e 24h após o último tratamento com FSH em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente (Baruselli et al., 2006, Bó et al., 2006).

No entanto, os protocolos de SOV para produção *in vivo* de embriões possuem a limitação da necessidade de elevado número de manejos para realização dos tratamentos. Com isso, uma série de estudos foram conduzidos visando reduzir o número de manejos durante SOV em doadoras (Baruselli et al., 2008). O uso de 3 doses de FSH resultou em similar produção de embriões quando comparado ao tradicional protocolo de 8 doses de FSH (Martins et al., 2008). Com base nesses estudos, foi possível reduzir o número de manejos dos animais durante o protocolo de SOV em doadoras *Bos indicus*. Entretanto, esses resultados não foram confirmados em doadoras *Bos taurus*, as quais são menos sensíveis às gonadotrofinas exógenas e apresentam maior metabolização hepática (Bó et al., 2006).

Considerando a necessidade de desenvolver um protocolo de superestimulação simplificado, estudos têm focado em alternativas para manter os níveis circulantes de FSH mais elevados e por um período mais prolongado após o tratamento. Uma alternativa é o uso de dose única de FSH diluído em solução contendo ácido hialurônico (polímero biodegradável; Tribulo et al., 2011). Vieira et al. (2016) relataram concentrações de FSH elevadas durante período prolongado (2 dias) em novilhas Holandesas tratadas com dose única de FSH diluído em solução 0,5% de ácido hialurônico. Outros estudos também relataram número similar de embriões transferíveis quando uma dose única de FSH IM (diluída em 2% de ácido hialurônico; Tribulo et al., 2011) ou duas doses de FSH IM (diluídas em 0,5 ou 1% de ácido hialurônico; Tribulo et al., 2012) foram administradas, comparadas ao tratamento tradicional com 8 doses IM de FSH de 12 em 12 horas.

Outra estratégia para reduzir o número de manejos da doadora, é o uso de uma única injeção intramuscular de gonadotropina coriônica equina (eCG) no protocolo P-36 com IATF em doadoras Nelore e Holandesas (revisado por Baruselli et al., 2008). O tratamento com eCG (1,500, 2,000 ou 2,500 IU) resultou em número de embriões transferíveis similar quando comparado ao tratamento com oito doses decrescentes de FSH em doadoras Nelore. Entretanto, a dose de 2,500 UI de eCG aumentou o número de folículos grandes anovulatórios no dia da recuperação dos embriões. Em vacas leiteiras *Bos taurus* (Holandesas), o tratamento com 2,000 ou 2,500 UI de eCG resultou em número semelhante de embriões transferíveis quando comparado ao tratamento com oito doses decrescentes de FSH. Entretanto, tratamentos sucessivos com eCG (após a terceira superestimulação) resultaram em produção reduzida de embriões. Com base nesses estudos, é possível verificar que a SOV com única dose de eCG pode ser uma alternativa para reduzir o número de tratamento e facilitar o manejo, porém o uso contínuo do eCG para superestimulação pode reduzir a produção de embriões.

Recentemente, pesquisadores estão avaliando a utilização de tratamento com dose única de FSH recombinante de longa ação (Carvalho et al., 2014). Os autores verificaram que o tratamento com dose única de FSH recombinante de longa ação produziu resposta superovulatória semelhante e produz embriões de boa qualidade quando comparado com duas administrações diárias durante 4 dias com pFSH, demonstrando potencial para simplificar o manejo de superovulação em doadoras de embrião.

## Fatores que interferem na qualidade oocitária e na PIVE

Diversos fatores influenciam o sucesso da produção *in vitro* de embriões, dentre eles, pode-se destacar a população folicular, a idade, o status reprodutivo, o status metabólico e o estresse térmico da doadora de oócitos.

A fim de contribuir com o ganho genético nos rebanhos de corte e leite, estão sendo realizados estudos para aumentar a eficiência da PIVE. Sabe-se que a quantidade de embriões produzidos está diretamente relacionada ao número de complexo cumulus-oócito (CCO) recuperados pelo procedimento de OPU. Essa quantidade de CCOs recuperados apresenta alta repetibilidade nas doadoras aspiradas (Monteiro et al., 2017) e deve ser considerada para aumentar a produção de embriões por procedimento. Ainda, estudos evidenciaram que animais com elevada população folicular apresentam maior quantidade de oócitos recuperados por OPU e maior produção de embriões por procedimento (Watanabe et al., 2017). Ainda, verifica-se que novilhas pré-púberes apresentam maior número de folículos disponíveis para aspiração (Revel et al., 1995; Landry et al., 2016), porém os índices de produção de



embriões *in vitro* desta categoria são inferiores aos de animais adultos (Guerreiro, 2015).

Diversos estudos (Durlinger et al., 2002; Fanchin et al. 2003; Batista et al. 2014) correlacionaram população folicular e o Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) em diferentes espécies, inclusive na espécie bovina, tanto para animais *Bos taurus* quanto *Bos indicus* (Baruselli et al., 2015a). Nosso grupo realizou um estudo na tentativa de estabelecer um marcador endócrino para a população folicular e a produção *in vitro* de embriões através da concentração circulante de AMH no plasma sanguíneo. Guerreiro et al. (2014b) realizaram a contagem da população folicular, a OPU-PIVE e a colheita de sangue para dosagem de AMH em 34 fêmeas Nelore e 59 fêmeas Holandesas. Para estabelecer a relação da eficiência da OPU-PIVE com a concentração de AMH, os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo composto de doadoras de alta e outro de baixa concentração de AMH (ponto de corte de 1,0 ng/mL para Nelore e de 0,3 ng/mL para Holandês). Foi possível observar correlação positiva entre a concentração plasmática de AMH e o número de folículos visualizados, total de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis e número de blastocistos produzidos. Os resultados sugerem que a concentração plasmática de AMH pode ser utilizada como marcador endócrino para prever a eficiência de um animal em programas de OPU-PIVE, e assim, selecionar doadoras com maior número de folículos para aumentar a eficiência da OPU-PIVE em *Bos indicus* e em *Bos taurus*.

Nos programas de melhoramento genético o intervalo de gerações influencia significativamente o ganho genético dos rebanhos. Nesse sentido, quanto mais jovens as doadoras, maior é o impacto dos programas de melhoramento (Baruselli et al., 2016b). A utilização da técnica de PIVE em animais jovens ainda apresenta comprometimentos devido à baixa competência oocitária (Majerus et al., 1999; Rizos et al., 2005; Landry et al., 2016). Estudos relatam que oócitos provenientes de bezerras e novilhas tem composição diferente dos oócitos de vacas por terem atividade enzimática e metabólica distintas (Warzych, et al. 2017), além de alterações na composição das proteínas e diferentes concentrações de LH e estradiol no ambiente folicular (Khatir et al., 1997). Em estudo realizado por Guerreiro et al. (2014b), um total de 120 doadoras de quatro categorias distintas foram utilizadas [novilhas pré-púberes (n = 30), novilhas púberes (n = 30), vacas em lactação (n = 30) e vacas não lactantes (n = 30)]. As doadoras foram aspiradas sem sincronização prévia da onda folicular. Imediatamente antes da OPU, todos os folículos foram quantificados e os folículos  $\geq 1,5$  mm foram puncionados. Os oócitos foram submetidos à PIVE com a mesma partida de sêmen do mesmo touro. Os embriões produzidos (n = 206) foram transferidos para receptoras *Bos taurus* x *Bos indicus*. Não foi observada diferença entre os grupos experimentais quanto ao número de folículos aspirados (P = 0,08). Apesar do número semelhante de total de oócitos recuperados (P = 0,12), as novilhas pré-púberes tiveram quantidade intermediária de oócitos viáveis, e as vacas não lactantes produziram mais oócitos viáveis (P = 0,03), quando comparadas com as vacas lactantes. Entretanto, doadoras pré-púberes tiveram taxa de clivagem (P < 0.0001) e taxa de blastocisto mais baixa (P < 0.0001) quando comparadas com as outras categorias (Tab.1).

Tabela 1. Número de folículos aspirados, oócitos e embriões produzidos após a OPU-PIVE em novilhas pré púbere e púbere, e vacas em lactação e secas da raça Holandesa.

	Novilhas		Vacas		Valor de P
	Pré-púberes	Púberes	Lactantes	Não Lactantes	
N	30	30	30	30	
Total de folículos aspirados	18,3 ± 2,1	17,3 ± 1,2	14,0 ± 1,0	17,7 ± 1,7	0,08
Total de CCO recuperados <sup>1</sup>	14,2 ± 2,2	13,1 ± 1,1	9,8 ± 1,1	14,6 ± 1,7	0,12
CCOs cultivados	10,5 ± 1,8 <sup>ab</sup>	8,3 ± 0,8 <sup>ab</sup>	6,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	11,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	0,03
Taxa de clivagem (%) <sup>2</sup>	68,6 <sup>b</sup>	98,8 <sup>a</sup>	87,6 <sup>a</sup>	90,1 <sup>a</sup>	< 0,0001
Blastocistos produzidos	0,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	< 0,0001
Taxa de blastocistos (%) <sup>3</sup>	4,8 <sup>c</sup>	12,7 <sup>b</sup>	18,0 <sup>b</sup>	36,5 <sup>a</sup>	< 0,0001

<sup>1</sup>CCO – complexos cumulus oócitos. <sup>2</sup>Número de embriões clivados/CCOs viáveis. <sup>3</sup>Número de blastocistos/CCOs viáveis. <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P < 0,05).

Portanto, conclui-se que doadoras Holandesas pré-púberes tem baixa competência para produção *in vitro* de embriões, sendo a categoria de vacas não lactantes a mais eficiente na PIVE. Embriões produzidos de animais pré-púberes resultaram em taxa de concepção inferior em comparação com embriões produzidos de vacas em lactação e não lactantes [pré-púberes: 0,0% (0/15)<sup>b</sup>; púberes: 9,7% (3/28)<sup>b</sup>; vacas em lactação: 28,6% (10/25)<sup>a</sup>; vacas não lactantes: 32,7% (36/74)<sup>a</sup>; P < 0,05]. No entanto, foi observada taxa de concepção semelhante para embriões produzidos de doadoras púberes e pré-púberes.

Outro estudo foi realizado com novilhas Nelore pré-púberes (*Bos indicus*) pertencentes ao Instituto de Zootecnia em Sertãozinho, no estado de São Paulo (Batista et al., 2016). Neste experimento foi avaliada a OPU-PIVE em diferentes idades e fases do ciclo estral. O delineamento experimental incluiu: novilhas pré-púberes de 8 a 12 meses de idade (n = 24), novilhas pré-púberes de 18 a 22 meses de idade (n = 20) e novilhas cíclicas de 22 a 26 meses (n = 25). Os dados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Número de folículos visíveis, CCOs e blastocistos (média ± EPM) depois da OPU/PIVE em novilhas pré-púberes e púberes da raça Nelore (*Bos indicus*).

	Novilhas pré-púberes (8-12 meses) (n = 24)	Novilhas pré-púberes (18-22 meses) (n = 20)	Novilhas púberes (22-26 meses) (n = 25)	Valor de P <sup>a</sup>	
				Idade <sup>b</sup>	Ciclicidade <sup>c</sup>
Total de folículos visualizados	19,7 ± 2,1	41,3 ± 5,28	34,0 ± 3,3	< 0,0001	0,0002
Total de CCOs recuperados	13,4 ± 1,7	30,8 ± 5,8	22,6 ± 3,2	< 0,0001	< 0,0001
Total de CCOs clivados	5,6 ± 0,8	14,8 ± 2,5	13,3 ± 1,9	< 0,0001	< 0,0001
CCOs cultivados	7,6 ± 1,0	16,8 ± 2,7	15,1 ± 2,2	< 0,0001	< 0,0001
Taxa de CCOs cultivados (%) <sup>d</sup>	57	54	60	0,13	0,5
Taxa de clivagem (%) <sup>e</sup>	73	88	84	< 0,0001	0,25
Blastocistos produzidos	1,5 ± 0,3	4,7 ± 0,9	7,2 ± 1,2	< 0,0001	< 0,0001
Taxa de blastocistos (%) <sup>f</sup>	20,2	28,1	47	0,05	< 0,0001

<sup>a</sup> Efeito do grupo avaliado. <sup>b</sup> Efeito da idade no grupo pré-púbere (8-12 meses vs 18-24 meses). <sup>c</sup> Efeito da ciclicidade (cíclica vs não cíclica). <sup>d</sup> Número de oócitos viáveis/ número total de oócitos. <sup>e</sup> Número de oócitos clivados/ número de oócitos cultivados. <sup>f</sup> Número de blastocistos/ número de oócitos cultivados.

Novilhas pré-púberes de idade entre 8 e 12 meses tiveram menor número de folículos visualizados e de oócitos recuperados do que novilhas mais velhas, independentemente da presença de ciclicidade. Não houve diferença entre os grupos experimentais na de CCOs cultivados ou na taxa de clivagem. No entanto, o número de blastocistos produzidos, bem como a taxa de blastocisto, aumentou tanto com o avanço de idade dos animais como após os animais tornarem-se cíclicos (Tab. 2). Estes trabalhos demonstram uma eficiência reduzida na PIVE em novilhas pré-púberes quando comparada com novilhas cíclicas e animais adultos.

Dentre outros fatores que interferem no sucesso da OPU-PIVE, o efeito do status reprodutivo da fêmea doadora de oócitos merece atenção. Em outro estudo realizado foi avaliado o efeito da gestação sobre a qualidade oocitária e a PIVE em novilhas Holandesas (Bayeux, 2017). Foram utilizadas 179 doadoras em 3 fases reprodutivas: novilhas pré-púberes (8 a 10 meses; n = 60); novilhas púberes (10 a 12 meses; n = 60) e novilhas prenhes (14 a 18 meses; n = 59). Todos os animais foram submetidos à OPU em estágios aleatórios do ciclo estral. A mesma partida de sêmen do mesmo touro foi utilizada para fertilizar os oócitos. As novilhas púberes apresentaram maior número de oócitos recuperados assim como CCOs cultivados em comparação com as outras categorias. No entanto, a taxa de clivagem foi semelhante entre novilhas púberes e novilhas prenhes. Destaca-se que as novilhas prenhes apresentaram maior número de embriões produzidos por OPU e também maior taxa de blastocisto quando comparadas com as outras categorias de novilhas (Tab. 3). Estes resultados indicam que as novilhas prenhes apresentam maior eficiência na PIVE quando comparadas com novilhas púberes e pré-púberes da raça Holandesa (*Bos taurus*).

Tabela 3. Número de oócitos recuperados, CCOs cultivados, blastocistos, taxa de clivagem e de blastocisto após OPU-PIVE em doadoras taurinas de diferentes categorias.

Item	Novilhas			Valor de P
	Pré-púberes (n = 60)	Púberes (n=60)	Prenhes (n=59)	
Total de oócitos recuperados, n	9.75 ± 1.29 <sup>b</sup>	15.6 ± 1.42 <sup>a</sup>	9.85 ± 1.60 <sup>b</sup>	0,02
Total de oócitos viáveis, n	4.67 ± 0.57 <sup>b</sup>	9.10 ± 0.95 <sup>a</sup>	5.63 ± 1.09 <sup>b</sup>	<0.0001
Taxa de clivagem <sup>3</sup> , %	14.6% <sup>c</sup>	32.8% <sup>b</sup>	41.1% <sup>a</sup>	<0.0001
Total de blastocistos, n	0.13 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.90 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.32 <sup>a</sup>	<0.0001
Taxa de blastocistos <sup>5</sup> , %	1.4% <sup>c</sup>	8.1% <sup>b</sup>	20.3% <sup>a</sup>	<0.0001

Outro fator importante a ser considerado na eficiência da OPU-PIVE é o estado nutricional e metabólico da doadora, que pode interferir com os padrões de crescimento folicular, secreção de hormônios reprodutivos e metabólicos, e qualidade oocitária em bovinos (Ashworth et al., 2009; Batista et al., 2013; Sales et al., 2015; Baruselli et al., 2016a). Estudo avaliaram que o estabelecimento da resistência periférica à insulina (RPI) em vacas repetidoras de serviço no final da lactação e em vacas secas interfere negativamente na qualidade oocitária e na PIVE. Corroborando com esses achados, Mingoti (2018) constatou a presença da RPI nessas categorias, associado



ao aumento de peso vivo e o escore de condição corporal dos animais. Porém, as vacas que apresentaram RPI nesse estudo não apresentaram comprometimento na taxa de blastocisto e no número de blastocistos por OPU.

O efeito do estresse térmico sobre a eficiência da PIVE é estudado por diversos grupos de pesquisa. O estresse térmico tem sido relacionado à menor eficiência na OPU-PIVE, principalmente de fêmeas taurinas criadas em regiões tropicais (Al-Katanani e Hansen, 2002; Ferreira et al., 2011). Segundo Ferreira et al. (2011), o estresse térmico tem efeito negativo sobre a competência oocitária de vacas holandesas, sendo este efeito mais pronunciado em vacas repetidoras de serviço, comprometendo significativamente a taxa de blastocisto. Apesar do efeito do estresse térmico sobre fêmeas *Bos taurus* estar bem estabelecido, Torres-Júnior et al. (2008) demonstraram efeito deletério prolongado (até 105 dias) do estresse térmico na dinâmica folicular ovariana e na competência oocitária em doadoras *Bos indicus*. Ainda, em estudo recente realizado por Ferreira et al. (2016), foi constatado que o estresse térmico altera a expressão de genes e reduz a função mitocondrial dentro do oócito em vacas repetidoras de serviço, reduzindo a qualidade oocitária e ocasionando a perda de fertilidade nessa categoria animal.

### **Tratamentos para melhorar a produção *in vitro* de embriões (PIVE)**

Diante das dificuldades expostas acima, diversos grupos de pesquisa têm estudado estratégias para melhorar a qualidade oocitária das doadoras com baixa eficiência na PIVE. O objetivo é tornar o processo da produção de embriões rentável nas diversas condições de manejo, possibilitando rápida e eficaz disseminação de material genético superior. Dentre os tratamentos desenvolvidos para melhorar a PIVE destaca-se a utilização de FSH, rBST, propilenoglicol e células tronco mesenquimais.

#### **Uso de FSH como estratégia para melhorar a PIVE**

O resultado de programas de PIVE está associado ao estágio do crescimento folicular no qual a OPU é realizada (Blondin et al., 1995; Hagemann et al., 1999; Fair et al., 1995; Hendriksen et al., 2004; Pavlok et al., 1992). Ocorre aumento no potencial de desenvolvimento oocitário conforme há aumento do diâmetro folicular e aproximação do momento de pico de LH (Arlotto et al., 1996; Lonergan, et al., 1994; Caixeta, et al., 2009; Sirard et al., 2012; Sirard et al., 2006). Portanto, é possível que exista um intervalo ideal durante o desenvolvimento folicular no qual a PIVE teria maior eficiência, e, neste contexto, o uso de protocolos de sincronização de onda folicular e superestimulação previamente à OPU pode ser uma estratégia para melhorar a eficiência desta biotecnologia.

A principal gonadotrofina atualmente utilizada para superestimulação é o hormônio foliculo estimulante (FSH). Algumas pesquisas relatam que a superestimulação com FSH aumenta o número de folículos disponíveis para aspiração (Goodhand et al., 1998; Majerus et al., 1999; Taneja et al., 2000). No entanto, Currin et al. (2017) afirmaram que o uso de FSH não eleva de fato o número de folículos, mas sim seu diâmetro. Em estudos realizados por Vieira et al. (2014), vacas Holandesas (*Bos taurus*) tratadas com FSH tiveram aumento na proporção de folículos médios e grandes que resultou em maior número de embriões produzidos por OPU. Esta afirmação vai de acordo com o fato de que apenas folículos que já atingiram o estágio antral de desenvolvimento são responsivos às gonadotrofinas. Kauffold et al. (2005) relataram que complexos cumulus-oócitos (COCs) recuperados de folículos maiores têm maior competência de desenvolvimento do que COCs provenientes de folículos menores.

A partir dos 11 meses de idade, novilhas apresentam competência de desenvolvimento *in vitro* para produção de embriões similar à de animais adultos, portanto, animais com menos de 11 meses necessitam de estimulação gonadotrópica para atingir algum grau de viabilidade na PIVE (Taneja et al., 2000). Revel et al. (1995) e Pérez et al. (2014) comprovaram que oócitos de novilhas pré-púberes tratadas com FSH tem maior capacidade de desenvolvimento até blastocisto. Batista et al. (2016) provaram que bezerras tratadas com FSH tiveram aumento no número de folículos visualizados e no número e taxa de oócitos cultivados em comparação com bezerras não tratadas.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos avaliando a eficiência do tratamento com FSH na PIVE em doadoras jovens. Foi realizado estudo utilizando novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses submetidas a duas aspirações foliculares (com um intervalo de 40 dias; *cross-over*; Silva et al. 2018). Metade dos animais de cada categoria receberam 100 mg de FSH administradas em 4 doses decrescentes e após 44 horas foram submetidas ao procedimento de OPU. Foi observado que o tratamento com FSH diminuiu a taxa de recuperação de oócitos de ambas as categorias. No entanto, as novilhas pré-púberes (12 meses) tratadas tiveram maior taxa de produção de blastocistos sobre o total de oócitos. Em estudo semelhante realizado pelo nosso grupo, Elliff et al. (2019) avaliou o efeito do tratamento com FSH sobre a PIVE de doadoras jovens da raça Gir (*Bos indicus*). Foram utilizadas 10 bezerras (3-10 meses), 10 novilhas púberes (16-22 meses) e 10 vacas adultas, sendo que metade dos animais de cada categoria recebeu tratamento com FSH em 4 doses decrescentes (bezerras: 80 mg; novilhas: 100 mg; vacas: 140 mg). Neste estudo foi observado que o tratamento com FSH aumentou a taxa de clivagem para as três categorias animais e o número de blastocistos por OPU aumentou em bezerras e vacas tratadas com FSH.



### Uso do rBST como estratégia para melhorar a PIVE

A superestimulação gonadotrófica pode ser realizada também associada à somatotropina bovina recombinante (rBST). A somatotropina é um hormônio de crescimento que influencia a regulação do crescimento e diferenciação de diversas células, além de controlar a atividade metabólica de diversos órgãos e tecidos (Kuzmina et al., 2006).

Gong et al., (1997) verificaram que o uso de rBST eleva significativamente as concentrações séricas de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e insulina, tendo efeito importante na proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de bovinos. O aporte de energia necessário para maturação e competência oocitária depende de IGF-1. Receptores IGF-1 são expressos na granulosa e no oócito, tendo efeitos trópicos importantes sobre o oócito. O aumento de IGF-1 está associado a maior atividade de GLUT1 nas células da granulosa e oócito, sendo este um fator essencial para a maturação oocitária (Zhou, et al. 2000).

O número de folículos disponíveis para aspiração aumenta quando a doadora é tratada com rBST (Lucy et al., 2000; Buratini et al., 2000). O mecanismo pelo qual o rBST aumenta o desenvolvimento folicular ainda não é inteiramente compreendido, mas acredita-se ter relação com o aumento de IGF-1. Bols et al., (1997) trataram novilhas com rBST semanalmente e observaram uma tendência para que o número de folículos aumentasse durante o período de aspirações para o grupo tratado. No entanto, não houve diferença quanto ao número de oócitos recuperados entre os grupos tratado e não tratado. Pavlok et al. (1996) aplicaram rBST em vacas uma vez e obtiveram como resultado oócitos de melhor qualidade, no entanto, não observaram diferenças quanto ao número de folículos entre animais tratados e não tratados. Além disso, estudos apontam que o uso de rBST melhora o desenvolvimento embrionário em *Bos taurus* (Izadyar et al. 1996; Moreira et al., 2001, Hasler et al., 2003; Martins et al., 2012), entretanto, não se verificou efeito positivo do tratamento com rBST em *Bos indicus* (Martins et al., 2012).

Em estudo realizado pelo nosso grupo (dados não publicados; Elliff et al., 2019), 49 bezerras (3-10 meses) da raça Holandesa (*Bos taurus*) foram divididas em 4 tratamentos: Controle (n=13), FSH (140mg em 4 doses decrescentes; n=12), rBST (500mg em dose única; n=11) e FSH+rBST (em mesma dosagem; n=13). O número de embriões por OPU aumentou em animais tratados com rBST, com FSH e principalmente com a associação dos tratamentos, sendo observado neste grupo (FSH+rBST) aumento de 4,6 vezes no número de embriões em relação ao grupo controle.

### Uso do propilenoglicol como estratégia para melhorar a PIVE

A variabilidade da taxa de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* pode ser influenciada pela dieta da doadora previamente à OPU, principalmente quando animais jovens são utilizados (Greer et al. 1992; Boland et al., 2001; Gamarra et al., 2015).

O propilenoglicol tem sido utilizado para o tratamento de cetose pós-parto em vacas de leite desde 1950 (Johnson 1954; Maplesden 1954). Vacas submetidas à infusão ruminal de propilenoglicol tem incremento de níveis circulantes de glicose e insulina e redução dos níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e betahidroxibutirato (BHBA; Gamarra et al. 2015). Gamarra et al. (2014) observaram que a utilização de propilenoglicol em novilhas da raça Holandesa durante curto prazo elevou os níveis séricos de glicose, insulina e IGF-1, que por sua vez estimulou o crescimento folicular, elevou o número de folículos pequenos (1-4 mm de diâmetro) e também melhorou a PIVE em animais com maior população folicular.

A administração de propilenoglicol modifica o ambiente folicular, devido a um aumento de IGF-1 no fluido folicular e alterações na expressão de genes que pertencem ao sistema IGF nas células do cumulus (Gamarra et al., 2018).

Alterações metabólicas no plasma tem alta correlação com alterações no líquido folicular (Walters et al. 2002; Leroy et al. 2004a, 2004b, 2005). Essas alterações podem refletir na qualidade do oócito do folículo recrutado e consequentemente influenciar o resultado na PIVE.

Em estudo recente realizado pelo nosso grupo (dados não publicados; Rezende et al., 2019), novilhas púberes, vacas secas e vacas em início de lactação foram divididas em dois grupos: tratadas com propilenoglicol durante 5 dias, e grupo controle. As novilhas tratadas com propilenoglicol tiveram maior taxa de desenvolvimento embrionário do que novilhas não tratadas. Vacas secas tratadas com propilenoglicol tiveram maior taxa de clivagem do que vacas de mesma categoria que não receberam tratamento. O maior efeito do tratamento foi sobre as vacas em início de lactação, que apresentaram maior taxa de clivagem e de blastocistos em relação a animais de mesma categoria que não receberam tratamento.

### Uso de células-tronco como estratégia para melhorar a PIVE

As células tronco mesenquimais (MSC) tem capacidade pró-regenerativa e propriedades imunomodulatórias através de sinalização parácrina e da habilidade de se locomover para os locais de injúria (Schin et al., 2013; Le Blanc et al., 2007; Ucceli et al., 2008; Kosaric et al., 2019). Essas características incentivaram estudos sobre doenças degenerativas com intuito de futuras aplicações terapêuticas (Romeo et al., 2012). Apesar das



MSC não apresentarem um potencial de diferenciação como os das células-tronco embrionárias (ESC), elas vêm sendo bastante utilizadas em tratamentos na medicina regenerativa, uma vez que são facilmente obtidas e isoladas, apresentam alta taxa de proliferação e podem se diferenciar em alguns tecidos, incluindo osteoblastos (Fakhry et al., 2013), condrócitos (Pittenger et al., 1999), adipócitos (Ong et al., 2013) e hepatócitos (Lee et al., 2004).

Visando o tratamento de problemas reprodutivos como a falência ovariana prematura, foi descrito que a utilização de MSC auxilia na recuperação de danos causados na secreção de hormônios, auxilia no reparo da foliculogênese, além de diminuir a apoptose das células ovarianas (Song et al., 2016). Reforçando a importância desse tipo celular, foram encontradas células-tronco mesenquimais junto à população de células da granulosa, sugerindo que esse tipo celular tem papel crucial na reprodução (Lange-Consiglio et al., 2016).

O transplante de MSC autólogas (provenientes do mesmo indivíduo) ou alogênicas (provenientes de outro indivíduo da mesma espécie) tem demonstrado resultados promissores na recuperação da funcionalidade de diversos órgãos. A utilização de MSC alogênicas na terapia celular tem aumentado consideravelmente, visto que a utilização destas células de doadores jovens e saudáveis permite rapidez e facilidade no tratamento com MSC, além de apresentarem propriedades imunorregulatórias (Marx et al., 2015). A terapia com MSC em ovários bovinos pode proporcionar aumento na quantidade de folículos e melhora na qualidade dos oócitos, com impacto positivo na PIVE.

Portanto, a utilização de células-tronco em fêmeas bovinas pode ser uma alternativa viável para promover aumento nos índices da produção *in vitro* de embriões com impacto econômico direto dessa tecnologia na bovinocultura. Em estudo recente realizado pelo nosso grupo (Soares et al., 2018), 27 vacas Nelore foram submetidas à sincronização de onda folicular e duas OPU com intervalo de 30 dias, após a segunda OPU, os animais foram divididos em três grupos experimentais: Controle (sem tratamento; n=7); MSC1 (tratamento com  $5 \times 10^6$  células-tronco em um ovário; n=10) e; MSC2 (tratamento com  $5 \times 10^6$  células-tronco em cada ovário; n=10). Após o tratamento com as MSC, os animais foram submetidos a sincronização de onda folicular e OPU aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Neste estudo foi possível verificar que os animais tratados com MSC tiveram aumento significativo na taxa de recuperação oocitária, taxa de oócitos viáveis, taxa de clivagem, taxa de blastocisto e taxa de blastocisto eclodido. Esses dados são indicativos de que essa tecnologia pode colaborar para melhorar a eficiência da OPU/PIVE em bovinos.

### Conclusões

Diversos fatores podem influenciar positivamente a PIVE, aumentando sua eficiência e tornando esse processo viável comercialmente. Muitos estudos têm buscado estratégias para aumentar a eficiência da PIVE. Existem ainda limitações relacionadas à reduzida qualidade e quantidade de oócitos recuperados. A principal estratégia para melhorar a produção de embriões é a utilização de gonadotrofinas associada ao protocolo de sincronização com progesterona. Os avanços nas pesquisas possibilitaram verificar que os tratamentos com FSH, rBST, propilenoglicol e células-tronco têm potencial para melhorar a qualidade oocitária e, conseqüentemente, a produção de embriões.

### Referências

- Al-Katanani Y, Hansen P.** Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.62, p.174, p.180, 2002.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML.** Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, p.943-956, 1996.
- Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG.** Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Phil Trans R Soc B*, v.364, p.3351-3361, 2009.
- Barros CM, Ereno RL, Simões RAL, Fernandes P, Buratini J, Nogueira, MFG.** Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.132-137, 2010.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA.** Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006.
- Baruselli PS, Martins CM Sales JNS, Ferreira RM.** Recent advances in bovine superovulation. *Acta Sci Vet*, v.36, p.433-448, 2008.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha, MF, Bó GA.** Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.134-141, 2012.
- Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH.** Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim Reprod*, v.12, p.487-497, 2015a.
- Baruselli PS, Vieira LM, Batista EOS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Torres-Júnior JRS, Martins CM, Sá Filho MF, Bó GA.** Produção *in vivo* e *in vitro* de embrião bovino: Atualizações sobre estratégias de produção de embriões. *Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 29, 20 a 23 de agosto, Gramado, RS, p.52-60, 2015b.



- Baruselli PS, Vieira LM, Sá Filho MF, Mingoti RD, Ferreira RM, Chiaratti MR, Oliveira LH, Sales JN, Sartori R.** Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. *Theriogenology*, v.86, p.263-269, 2016a.
- Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales JNS, Souza AH, Gimenes LU.** Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental and reproductive stages. *Anim Reprod*, v.13, p.264-272, 2016b.
- Batista EOS, Sala RV, Ortolan, MDDV, Del Valle TA, Macedo GG, Rennó FP, Baruselli PS.** Ovarian and endocrinology responses in Taurus and Zebu heifers submitted to different nutrition challenges. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 29th to September 1st, 2013, Praia do Forte, BA, Brazil, p.444, 2013. (Resumo).
- Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RNVR, Rennó FP, Baruselli PS.** Plasma anti-Müllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) heifers. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.448-452, 2014.
- Batista EOS, Guerreiro BM, Freitas BG, Silva JCB, Vieira LM, Ferreira RM, Rezende RG, Basso AC, Lopes RNVR, Rennó FP, Baruselli PS.** Domestic Animal Endocrinology Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domest Anim Endocrinol*, v.54, p.1-9, 2016.
- Bayeux BM, Carvalho LM, Mingoti RD, Watanabe YF, Oliveira AS, Chiba MO, Azrak AJ, Castro PMN, Souza AH, PS Baruselli.** Effect of animal category (prepubertal, pubertal and pregnant) on in vitro embryo production in Holstein heifers. *Anim Reprod*, v.13, n.3, p.488, 2016. (Resumo).
- Blondin P, Sirard MA.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.54-62, 1995.
- Bó GA, Baruselli PS, Chesta P, Martins CM.** The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101, 2006.
- 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.
- Bols PEJ, Lein A, Ysrbaert MT, Van Soom A, Kruif A.** Effects of a long-term treatment with bovine somatotropin on oocyte and blastocyst yield after OPU/IVF. *Theriogenology*, p.315, 1997. (Resumo).
- Bordignon V, Morin N, Durocher J, Bousquet D, Smith LC.** GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology*, v.48, p.291-298, 1997.
- Buratini J, Price CA, Visintin JA, Bó GA.** Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-431, 2000.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MAN.** Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.655-664, 2009.
- 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* *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.167-175, 2008.
- Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Baez GM, Dresch AR, Guenther JN, Fricke PM.** Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*, v.82, p.481-489, 2014.
- Currin L, Michalovic L, Bellefleur A, Gutierrez K, Glanzner W, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, Rosa PR, Cesaro MP, Lopez R, Grand F, Vigneault C, Blondin P, Gourdon J, Baldassare H, Bordignon V.** The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the in vitro embryo development of Holstein calf oocytes. *Theriogenology*, v.104, p.87-93, 2017.
- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN.** Antimüllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, v.143, p.1076-1084, 2002.
- Elliff FM, Feres, LF, Bayeux, BM, Colli, MHA, Guimarães, EC, Baruselli, PS.** Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on *in vitro* embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. 45th Annual Conference of the International Embryo Technology Society, 20 a 23 janeiro, 2019, New Orleans, Louisiana, 2019. (Resumo).
- Fair T, Hyttel P, Greve T.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.437-442, 1995.
- Fakhry, M, Hamade, E, Badran, B, Buchet, R, Magne, D.** Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*, v. 5, p.136-148, 2013.
- Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J.** Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*, v.18, p.323-327, 2003.





- Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA, Joaquim DC, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS.** The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J Dairy Sci*, v.94, p.2383-2392, 2011.
- Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS.** The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. *Biol Reprod*, v.94, p.1-10, 2016.
- Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Le Guiene B, Humblot P, Deloche MC, Monniaux D, Ponter AA.** Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Mullerian hormone profiles. *Reproduction, Fertil Dev*, v.27, p.1249-1261, 2015.
- Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Le Guienne B, Deloche MC, Monniaux D, Ponter AA.** Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. *Livest Sci*, v.162, p.240-251, 2014.
- Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Nuttinck F, Cordova DHA, Mermillod P, Marquant-Le GB, Monniaux D, Humblot P, Ponter AA.** Oral propylene glycol modifies follicular fluid and gene expression profiles in cumulus-oocyte complexes and embryos in feed-restricted heifers. *Reproduction Fertil Dev*, v.30, p.417-429, 2018.
- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Júnior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JPB, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852-858, 2008.
- Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho MF, Meirelles FV, Trinca LA, Rennó FP, Watanabe YF, Baruselli PS.** The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, v.83, p.385-393, 2015.
- Gong JG, Baxter G, A BT, Webb R.** Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil*, v.110, p.91-97, 1997.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ.** In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1998.
- Greer RC, Staigmiller RB, Parrish JJ.** Female traits, ovary and follicle characteristics, and the conditional probability of normal Propylene glycol and embryo production in heifers oocyte development after superovulation of beef cows. *J Anim Sci*, v.70, p.263-272, 1992.
- Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P.** In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J IVF Embryo Transfer*, v.4, p.281-285, 1987.
- Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, Bayeux BM, Dias EA, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RN, Baruselli PS.** Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol*, v.49, p.96-104, 2014a.
- Guerreiro BM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CRA, Vieira LM, Oliveira RC, Freitas BG, Baruselli PS.** Prepubertal Holstein heifers have low efficiency when submitted to ovum pick-up and in vitro embryo production. *Anim Reprod*, v.11, p.405, 2014b. Abstract.
- Guerreiro BM.** Produção in vitro de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- Hagemann LJ, Beaumon SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ.** Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev*, v.53, p.451-458, 1999.
- Hasler JF, Bilby CR, Collier RJ, Denham SC, Lucy MC.** Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, v.59, p.1919-1928, 2003.
- Hendriksen PJ, Steenweg WN, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PL.** Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.909-920, 2004.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM.** In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.372-377, 1996.
- Johnson RB.** The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Vet*, v.44, p.6-21, 1954.
- Kauffold J, Amer HAH, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj A.** The In Vitro Developmental Competence of Oocytes from Juvenile Calves is Related to Follicular Diameter. *J Reprod Dev*, v.51, p.325-332, 2005.
- Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P.** Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *J Reprod Fertil*, v.111, p.267-275, 1997.
- Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner G.** Stem Cell Therapies for Wound Healing. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>.
- Kuzmina TI, Alm H, Denisenko V, Tuchscherer A, Kanitz W, Torner H.** Effect of Recombinant Bovine



- Somatotropin ( rbST ) on Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes and Their Developmental Competence In Vitro. *J Reprod Dev*, v.53, p.309-316, 2006.
- Landry DA, Bellefleur A, Labrecque R, Grand F, Vigneault C, Blondin P, Sirard M.** Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*, v.86, p.1240-1246, 2016.
- Lange-Consiglio A, Romaldini A, Correani A, Corradetti B, Esposti P, Cannata MF, Perrini C, Marini MG, Bizzaro D, Cremonesi F.** Does the Bovine Pre-Ovulatory Follicle Harbor Progenitor Stem Cells? *Cell Reprogram*, v.18, p.116-126, 2016.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK.** In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, v.40, p.1275-1284, 2004.
- Le Blanc K, Ringden O.** Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*, v.262, p.509-25, 2007.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL.** Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, v.36, p.376-383, 1987.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, Kruif A.** Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, v.62, p.1131-1143, 2004a.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Kruif, A.** Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.80, p.201-211, 2004b.
- Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, Kruif G, Genicot G, Van Soom, A.** Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, v.130, p.485-495, 2005.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I.** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.48-53, 1994.
- Lucy MC.** Regulation of Ovarian Follicular Growth by Somatotropin and Insulin-Like Growth Factors in Cattle. *J Dairy Sci*, v.83, p.1635-1647, 2000.
- Majerus V, Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I.** Embryo Production by Ovum Pick Up in Unstimulated Calves Before and After Puberty. *Theriogenology*, v.52, p.1169-1179, 1999.
- Maplesden DC.** Propylene glycol in the treatment of ketosis. *Can J Comp Med Vet Sci*, v.18, p.287-293, 1954.
- Marquant-Le Guienne B, Gerard M, Solari A, Thibault C.** In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. *Reprod Nutr Dev*, v.29, p.559-568, 1989.
- Martins CM, Reis PO, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Baruselli PS.** Efeito da sincronização da onda de crescimento folicular e do tratamento com bST ou eCG na OPU-PIV de doadoras Nelore, Brangus e Holandesas. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 30 de agosto a 2 de setembro, 2012, Foz do Iguaçu, Paraná, p.403, 2012. (Resumo)
- Martins CM, Santos ICC, Valentim R, Sales JNS, Reis PO, Crepaldi GA, Baruselli PS, D'occhio MJ.** Efeito da redução do número de administrações de FSH na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *Acta Sci Vet*, 2008.
- Marx C, Silveira MD, Beyer Nardi N.** Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells and Development*, v.24, p.803-813, 2015.
- Mingoti RD.** Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação. 132f. Tese de doutorado (Ciência Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2018.
- Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS.** Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, v.90, p.54-58, 2017.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW.** Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*, v.84, p.1646-1659, 2001.
- Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans ACO.** Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*, v.88, n.92, p.1-9, 2013.
- Nogueira MFG, Barros BJ, Teixeira AB, Trinca LA, D'occhio MJ, Barros CM.** Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1625-1634, 2002.
- Ong WK, Sugii S.** Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.45, p.1083-1086, 2013.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.63-67, 1992.
- Pavlok A, Koutecka L, Krejci P, Slavik T, Cerman J, Slaba J, Dorn D.** Effect of recombinant bovine



- somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.41, p.183-192, 1996.
- Pérez AM, Brien O, Mészáros G, Utsunomiya YT, Sonstegard TS, Garcia JF, Tassell CP, Carneiro R, Marcos VB, So J.** Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using medium and high density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. *Livest Sci*, v.166, p.121-132, 2014.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.
- Pontes JHF, Silva, KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM.** Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, v.74, p.1349-1355, 2010.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y.** Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil*, v.103, p.115-120, 1995.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In Vitro* Versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.
- Rizos, D, Burke, L, Duffy, P, Wade, M, Mee, J. F, O'Farrell, K. J, Macsiurtain, M, Boland, M. P, Lonergan, P.** Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v. 63, n. 3, p. 939-949, 2005.
- Romeo F, Costanzo F, Agostini M.** Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin? *Aging (Albany NY)*, v.4, n.12, p.878-886, 2012.
- Sales JN, Iguma LT, Batista RI, Quintão CC, Gama MA, Freitas C, Pereira MM, Camargo LS, Viana JH, 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.3086-3099, 2015.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC.** Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- Shin L, Peterson DA.** Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*, v2. p.33-42, 2013.
- Silva LG, Bayeux BM, Rodrigues NN, Elliff FM, Mingoti RD, Colli MHA, Monteiro FM, Baruselli PS.** *In vitro* produced embryos with 12 and 24 month old Nelore (*Bos indicus*) heifers treated or not with FSH. *Anim Reprod*, v.15, p.406, 2018. (Resumo)
- Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C.** Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.
- Sirard MA.** Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.148-155, 2012.
- Soares JG, Rossi GF, Bayeux BM, Moraes GFA, Elliff, FM, Watanabe YF, Monteiro FM, Rodrigues NN, Sales JNS, Nogueira MFG, Baruselli PS, Lo Turco EG.** Effect of stem cells application on the oocyte and embryo production of bovine females. *Anim Reprod*, v.15, p.521, 2018. (Resumo)
- Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, Gao L, Wang G, Liu Z, Li H, Ding H, Wu H, Wang F, Wang J.** Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int*, v. 2517514, p.7, 2016.
- Taneja M, Bols PEJ, Velde A, Van De Ju J, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X.** Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes *In Vitro* and *In Vivo*: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. *Biol Reprod*, v.62, p.206-213, 2000.
- Torres-Júnior JRDS, Pires MDFA, Sá WF, Ferreira ADM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CAA, Sá Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS.** Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.69, p.155-166, 2008.
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA.** Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.7-13, 2011.
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bó GA.** Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, v.77, p.1679-1685, 2012.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V.** Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v.8, p.726-736, 2008.
- Van de Leemput EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM, Weijden GC, Dieleman SJ.** Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers super ovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.
- Vieira LM, Rodrigues, CA, Castro Netto, A, Guerreiro, BM, Silveira, CRA, Moreira, RJC, Sá Filho, MF, Bó, GA, Mapletoft, RJ, Baruselli, PS.** Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.82, p.318-324, 2014.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Netto AC, Guerreiro BM, Silveira CRA, Freitas BG, Mapletoft RJ, Baruselli PS.**



Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*, v.85, p.877-886, 2016.

**Walters AH, Pryor AW, 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.

**Warzych E, Pawlak P, Pszczola M, Cieslak A, Lechniak D.** Prepubertal heifers versus cows – The differences in the follicular environment. *Theriogenology*, v.87, p.36-47, 2017.

**Watanabe YF, Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS, Baruselli PS.** Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod*, v.14, p.635-644, 2017.

**Zhou J, Bievre M, Bondy CA.** Reduced GLUT1 expression in *Igf1*<sup>-/-</sup> null oocytes and follicles. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, v.10, p.111-117, 2000.

---