



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA**

Daniele Campos Araújo da Costa

**EFEITO DA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PRENHEZ EM UM SISTEMA
COMERCIAL DE EMBRIÕES BOVINOS**

Curitibanos
2025

Daniele Campos Araújo da Costa

**EFEITO DA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PRENHEZ EM UM SISTEMA
COMERCIAL DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Vitor Braga Rissi.

Curitibanos
2025

Costa, Daniele Campos Araújo da
Efeito da atenuação do estresse de retículo
endoplasmático sobre o desenvolvimento embrionário e taxa
de prenhez em um sistema comercial de embriões bovinos /
Daniele Campos Araújo da Costa ; orientador, Vitor Braga
Rissi, 2025.
49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária Convencional e Integrativa,
Curitibanos, 2025.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2.
Embrião. 3. Bovino. 4. Ácido Tauroursodesoxicólico. 5.
FIV. I. Rissi, Vitor Braga. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária Convencional e Integrativa. III. Título.

Daniele Campos Araújo da Costa

**EFEITO DA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PRENHEZ EM UM SISTEMA COMERCIAL DE
EMBRIÕES BOVINOS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 26 de março de 2025, pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Werner Giehl Glanzner, Dr.
McGill University

Luiz Ernani Henkes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para
obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Vitor Braga Rissi, Dr.
Orientador

Curitibanos, 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sempre a Deus, o meu eterno Senhor e Salvador da minha vida, a Ele toda honra e glória.

Aos meus pais Paulo Araújo Filho e Rachel Campos Araújo por sempre me apoiarem e mostrarem a forma e o caminho correto a seguir.

A minhas irmãs Rachel, Cristiane, Caroline, Viviane, cunhados Nehemias, Emerson, John, Bruno e sobrinhas e sobrinhos queridos por sempre cuidarem de mim e trazerem tanta alegria aos meus dias.

Ao meu filho Gabriel (in memoriam) sempre em meu coração e pensamentos e um dia pessoalmente nos encontraremos no céu, te agradeço por sempre me incentivar e apoiar nos meus sonhos.

Ao meu orientador e professor, Vitor Braga Rissi, agradeço por ter aceitado em me orientar nesse mestrado, pela sua dedicação e paciência.

A todos os professores e colaboradores do curso de pós-graduação da UFSC, campos de Curitiba, em especial ao Prof. Marcos Barreta e Dr. André que me auxiliaram nesse trabalho e por toda a dedicação no ensino e correções.

Ao professor Werner Giehl Glanzner e Luiz Ernani Henkes por aceitarem participar da minha banca e me auxiliar nas correções e informações para melhoria desse trabalho.

A todos do laboratório Treze Tílias Embriões, em especial minha amiga Anna Carolina Palavro e a cada um que me ajudou na realização e compilação dos dados desse experimento.

Ao Professor Flavio Meirelles pelas dicas, correções e contínuo ensinamentos sempre que nos encontramos é um novo aprendizado.

As queridas Yeda e Aline, amigas e colegas do Laboratório Vitrogen que me apoiaram nessa reta final.

Ó SENHOR, SENHOR NOSSO, QUÃO ADMIRÁVEL É O TEU NOME EM TODA A TERRA, POIS PUSESTE A TUA GLÓRIA SOBRE OS CÉUS! TU ORDENASTE FORÇA DA BOCA DAS CRIANÇAS E DOS QUE MAMAM, POR CAUSA DOS TEUS INIMIGOS, PARA FAZER CALAR AO INIMIGO E AO VINGADOR.

QUANDO VEJO OS TEUS CÉUS, OBRA DOS TEUS DEDOS, A LUA E AS ESTRELAS QUE PREPARASTE; QUE É O HOMEM MORTAL PARA QUE TE LEMBRES DELE? E O FILHO DO HOMEM, PARA QUE O VISITES? POIS POUCO MENOR O FIZESTE DO QUE OS ANJOS, E DE GLÓRIA E DE HONRA O COROASTE.

FAZES COM QUE ELE TENHA DOMÍNIO SOBRE AS OBRAS DAS TUAS MÃOS; TUDO PUSESTE DEBAIXO DE SEUS PÉS: TODAS AS OVELHAS E BOIS, ASSIM COMO OS ANIMAIS DO CAMPO, AS AVES DOS CÉUS, E OS PEIXES DO MAR, E TUDO O QUE PASSA PELAS VEREDAS DOS MARES.

Ó SENHOR, SENHOR NOSSO, QUÃO ADMIRÁVEL É O TEU NOME SOBRE TODA A TERRA!

SALMOS 8

RESUMO

A produção de embriões bovinos por fertilização *in vitro* (FIV) no mundo ultrapassou a dos produzidos *in vivo* e tem tendência de crescimento devido às vantagens que a técnica proporciona. Apesar desta condição a qualidade do embrião *in vitro* ainda é inferior ao do embrião *in vivo*, em especial relativo as taxas de gestação e nascimentos. O mal funcionamento do retículo endoplasmático (RE), causado por estresse do cultivo *in vitro*, pode levar a incapacidade de desdobramento de proteínas e na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), ativando a autofagia e apoptose. O TUDCA (ácido ursodesoxicólico) é um ácido biliar natural encontrado principalmente em ursos e em pequena quantidade em humanos. Quando utilizado como suplemento em meios de cultivo, resulta na atenuação do estresse de RE. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento de embriões com TUDCA sobre a taxa de clivagem e blastocisto *in vitro* assim como as taxas de prenhez após transferência à fresco para receptoras sincronizadas. Ao todo foram aspiradas 419 vacas em rotinas de produção comercial de embriões, sendo 184 de raças leiteiras (holandesas) e 235 de raças de corte (10 raças). Dos 6.861 oócitos colhidos, 4.808 foram maturados *in vitro* e, posteriormente fecundados. Após o processo de fertilização os zigotos foram divididos nos tratamentos com 100 μ M de TUDCA durante todo o período de cultivo ($n = 2.386$) ou controle ($n = 2.422$). Taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas por ANOVA utilizando software JMP-SAS. No total, 1.481 embriões foram produzidos e avaliados nos dias 7 e 9 após a fertilização, resultando em 536 transferências de embriões frescos, 442 congelados e 503 de qualidade inferior ou não prontos para congelar ou transferir no D7 ou D8. O grupo tratado com TUDCA apresentou uma taxa de blastocisto 5% maior por oócito cultivado em comparação ao grupo controle ($47,33 \pm 3,5\%$ e $36,22 \pm 3,0\%$, respectivamente; $P < 0,05$) nas raças de corte. Os dados de clivagem não apresentaram diferença estatística. Da mesma forma, nas raças de leite, não houve diferença significativa nas taxas de clivagem e blastocisto. Das 536 transferências, fizemos diagnóstico em 438 receptoras que resultaram em 211 gestações entre os dias 30 e 45 após a TE. As taxas de gestação foram avaliadas por teste de Qui-quadrado conforme procedimento do software JMP-SAS. As taxas de prenhez no grupo tratado com TUDCA e controle foi de 49,01% e 42,03% respectivamente, em vacas de corte. No entanto, em vacas de leite, o tratamento com TUDCA resultou em uma taxa de 65,52% enquanto para o grupo controle a taxa foi de 41,44%, sendo o grupo tratado estatisticamente superior ao grupo controle. O tratamento com TUDCA melhora significativamente a qualidade de embriões em vacas de corte e de leite, seja pelo aumento nas taxas de blastocisto, observado em vacas de corte ou pelo aumento nas taxas de prenhez observado nas vacas de leite. Mais estudos serão necessários para avaliar os reais parâmetros de qualidade e mecanismos moleculares responsáveis por esses achados.

PALAVRAS-CHAVE: Embriões, FIV, Bovinos, TUDCA, Taxa de Prenhez

ABSTRACT

Global production of bovine embryos through *in vitro* fertilization (IVF) has surpassed *in vivo* methods, driven by advancements in *in vitro* techniques. Nonetheless, the quality of *in vitro* embryos remains inferior to *in vivo* embryos, especially regarding pregnancy and birth rates. *In vitro* production stress can lead to endoplasmic reticulum (ER) dysfunction, impairing protein folding and generating reactive oxygen species, which may induce autophagy and apoptosis. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a bile acid mainly derived from bears and present in small amounts in humans, mitigates ER stress as a culture media supplement. This study evaluated the impact of TUDCA on the cleavage and blastocyst rates of *in vitro* embryos and the pregnancy rate after transfer to synchronized recipients. A total of 419 cows were aspirated in a commercial embryo production setting—184 dairy (Holstein) and 235 beef cows from 10 breeds. From 6,861 oocytes collected via ovum pick-up (OPU), 4,808 matured and were fertilized *in vitro*. The resulting zygotes were divided into two groups: one treated with 100 μ M TUDCA throughout cultivation ($n = 2,386$) and a control group with no treatment ($n = 2,422$). Cleavage and blastocyst rates were analyzed using ANOVA via JMP-SAS software. A total of 1,481 embryos were evaluated on days 7 and 9 post-fertilization, resulting in 536 fresh transfers, 442 frozen transfers, and 503 embryos identified as lower quality or unfit for transfer or freezing on day 7, which were discarded on day 9. The TUDCA-treated group demonstrated a 5% higher blastocyst rate per cultured oocyte than the control, with rates of $47.33 \pm 3.5\%$ and $36.22 \pm 3.0\%$, respectively ($P < 0.05$). No significant differences in cleavage rates were noted between the groups, nor among dairy breeds. Of the 536 fresh embryos transferred, 438 were assessed via ultrasound for pregnancy between 30 and 45 days post-transfer, resulting in 211 confirmed pregnancies. Pregnancy rates were analyzed using the chi-square test via JMP-SAS software. In the beef group, pregnancy rates were similar at 49.01% for TUDCA-treated and 42.03% for the control group. Conversely, the TUDCA-treated milk group exhibited a significant pregnancy rate of 65.52%, compared to 41.44% in the control group. From the data obtained, we concluded that the group treated with TUDCA had a 5% higher blastocyst rate per cultured oocytes compared to the control group, therefore the TUDCA treatment group had a positive effect on the production and quality of the embryos, and in relation to pregnancy rates in the milk group treated with TUDCA was also statistically significant, being 65.51%, while the control group was 41.44%.

KEYWORDS: Embryos, IVF, Cattle, TUDCA, Pregnancy Rate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das etapas dos procedimentos de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (OPU, MIV, FIV, CIV e CRIO/TE)	18
Figura 2. Bomba a vácuo para OPU, linha e sistema de aspiração completo mostrando o funcionamento durante uma aspiração.	19
Figura 3. A) Esquematização da metodologia de Ovum pick up (OPU). B) Posição do transdutor do US, juntamente com a guia de OPU C) Visualização do fundo da vagina do animal para a punção dos folículos no ovário. D) Visualização do ovário e folículos – imagem de US	20
Figura 4. Classificação dos oócitos segundo a IETS	21
Figura 5 – Dados gerais da produção de todos os animais do experimento juntos e depois separado por aptidão corte e leite com a média de oócitos aspirados por OPU, oócitos grau 1 e 2, cultivados, clivados e produção de blastocisto demonstrados em número absoluto	34
Figura 06 – Porcentagem de CCO's Graus 1 e 2 nas raças de leite e corte	34
Figura 07 – Porcentagem de clivagem e produção de blastocisto em todos os animais juntos e diferenciando o grupo controle do tratado e depois separando por corte e leite, também grupo comparando grupo tratado e controle.....	35
Figura 08 – Porcentagem da Taxa de prenhez separando por leite e corte	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Complexo Oócito Cumulus (CCO)	21
Tabela 2. Classificação dos Estágios de Desenvolvimento do Embrião	32
Tabela 3. Classificação Morfológica dos Embriões Quando ao Grau de Qualidade.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Aspecto comercial da Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	15
2.2. Produção <i>in vitro</i> De Embriões Bovinos	17
2.2.1. Ovum Pick Up (OPU)	18
2.2.2. Seleção dos Oócitos	20
2.2.3. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	22
2.2.4. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	23
2.2.5. Cultivo embrionário <i>in vitro</i> (CIV)	24
2.3. Estresse de Retículo Endoplasmático	24
2.3.1 Retículo Endoplasmático (RE)	24
2.3.2 Ácido tauroursodesoxicólico (TD)	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivo Específico	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Aspiração folicular	28
4.2. Maturação <i>in vitro</i>	29
4.3. Fertilização <i>in vitro</i>	30
4.4. Cultivo dos Embriões	30
4.5. Tratamento com TUDCA	31
4.6. Taxa de Clivagem e Classificação dos Embriões	31
4.7. Taxa de Prenhez	33

4.8. Análises Estatísticas dos dados	33
5. RESULTADO	33
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1-INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é umas das tecnologias aplicadas à reprodução animal, que multiplica rapidamente animais de alto mérito genético e de produtividade superior, disseminando melhor genética de fêmeas e machos, podendo ser aplicada em rebanhos de leite e de corte (BARUSELLI, *et al* 2019). A aspiração folicular de fêmeas jovens a partir de seis meses de idade pode ser feita, aumentando o ganho genético do rebanho através de menor intervalo de gerações e permitindo o uso de jovens matrizes para a produção das novilhas de reposição com uma genética superior (VARAGO *et al.*, 2008). Com a técnica de PIVE os produtores conseguem acelerar o crescimento genético do seu rebanho em pelo menos três gerações, aumentando sua produtividade e lucratividade, e intensificando a quantidade de animais geneticamente superiores (MELLO *et al.*, 2016, FABER *et al.*, 2003). SILVA *et al.* (2015), relata que com a utilização da PIVE já foram produzidas mais de 50 gestações de uma só doadora em um único ano.. A técnica de PIVE também possibilita a produção de embriões de novilhas ou vacas gestantes (até o terceiro ou quarto mês de gestação) ou ainda de fêmeas de alto valor genético que se tornaram inférteis, devido problemas físicos e ou anatômicos, como aderência tubária, lesão ou obstrução uterina devido a um parto distócico, ou que simplesmente não respondem mais aos hormônios de superovulação (WATANABE *et al.*, 2008).

No entanto, alguns fatores podem limitar a produção de embriões de FIV, como a idade das doadoras, raça, estágio do ciclo estral, alta lactação, além de nutrição desbalanceada associados as alterações no manejo nutricional que podem levar a diminuição do escore corporal, resultando em baixa qualidade oocitária e de embriões (RIZOS *et al.*, 2005; GRIMARD *et al.*, 2013). Outros fatores relacionados ao clima, fotoperíodo, umidade, pluviometria, estação do ano com temperaturas extremas, podem, da mesma forma, interferir na qualidade dos oócitos, bem como o ambiente onde os embriões são cultivados tem um impacto significativo na qualidade de seu desenvolvimento. Condições inadequadas de temperatura, pH, O₂ e CO₂ podem afetar negativamente a produção dos embriões. A qualidade do ar e a ausência de contaminantes também são importantes para evitar a morte celular ou o desenvolvimento anormal dos embriões (JOHNSON & MC CONNELL, 2004).

O meio de cultivo, sua composição, temperatura e o tempo de incubação são outros aspectos importante para uma boa produção de embriões de FIV. A escolha do meio, bem como

o cuidado na manipulação do embrião durante a sua cultura, pode influenciar diretamente a taxa de desenvolvimento e a qualidade dos embriões e refletem no sucesso da produção (GARDNER & WALE, 2013). Os objetos de pesquisa atualmente visam produzir embriões de melhor qualidade e que resultarão em uma maior taxa de prenhez, tentando minimizar ao máximo esses fatores citados anteriormente. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi de avaliar se o tratamento dos embriões com o ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA), melhorara as taxas de produção de blastocistos, e produção de embriões de melhor qualidade que resultem em melhores taxas de prenhez quando transferidos à fresco em fêmeas receptoras previamente sincronizadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Aspecto Comercial Da Produção *in vitro* De Embriões Bovinos

Em 1980 foi realizada a primeira transferência de embrião *in vivo* e por volta de 1990, o Brasil já tinha um mercado forte na produção e transferência de embriões bovinos (RUBIN, 2005). Os primeiros registros de prenhez de bezerros produzidos *in vitro* foram descritos pela equipe da UNESP em 1993 e pela Cenargen em 1994 em parceria com a Embrapa. Em 1996 a equipe da USP de Ribeirão Preto conseguiu os primeiros nascimentos de bezerros Nelore PO (Puro de Origem) com produção 100% *in vitro*; neste mesmo ano foram obtidas as primeiras prenhez de embriões produzidos *in vitro* e criopreservados (WATANABE *et al.*, 2008). Enquanto isso, a Europa, Ásia e Oceania já lideravam o uso dessa tecnologia para o mercado abrangendo grande parte dos 400.000 embriões produzidos (360.656 *in vivo* e 41.642 *in vitro*) (THIBIER, 1998).

Em 2012 e 2013 o Brasil tornou-se líder mundial no uso da técnica de produção *in vitro* de embriões, e em 2014 foi considerado o maior produtor de embriões bovinos *in vitro* do mundo, produzindo cerca de 366.517 embriões (GONÇALVES E VIANA, 2019). No ano de 2017, segundo os registros da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), o total de embriões de PIV (992.289) ultrapassou os da produção *in vivo* (406.287) (VIANA, 2018). Hoje a produção de embriões no mundo já alcança a casa dos 2 milhões, e segundo o levantamento de VIANA em 2021, do ano de 2001 a 2020, observou-se um crescimento de 80% nos embriões FIV quando comparado a embriões produzidos *in vivo* (convencional),

principalmente devido a não utilização de hormônios, e através do aperfeiçoamento da técnica e profissionais capacitados.

As produções em maior escala e os laboratórios comerciais tiveram início em 1998 e a partir daí graças a vários avanços nas pesquisas desenvolvendo meios mais apropriados para o cultivo, a PIVE passou da fase de experimentação para fase comercial tornando disponível aos produtores, como uma ferramenta tecnológica (MELLO *et al.*, 2016). A produção de embriões através da FIV permite produzir em menor tempo, o maior número de embriões de melhor potencial genético para crescimento do próprio rebanho, bem como disponibilizar para o mercado interno e externo genética de ponta através da comercialização dos embriões frescos ou congelados (RUMPF, 2007).

Entretanto, o custo alto dos equipamentos, montagem e manutenção do laboratório, bem como a necessidade de mão-de-obra especializada, meios de qualidade e padronização da técnica tem ainda sido alguns dos problemas enfrentados pelos laboratórios comerciais (WATANABE *et al.*, 2008). A quantidade e qualidade dos oócitos estão diretamente ligados ao sucesso da técnica e a enorme variação dos resultados que se dá devido a fatores como idade, raça, estresse térmico, manejo inadequado e qualidade de sêmen (PONTES *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011, BARUSELLI *et al.*, 2012).

Atualmente o mercado vem se tornando cada vez mais exigente, buscando animais mais precoces, de maior produtividade e qualidade dos seus produtos, impulsionando crescimentos na cadeia produtiva de carne e leite, porém com redução dos custos e aumento do bem-estar animal e visando uma cadeia produtiva sustentável e com produtos de valor agregado. De acordo com isso a PIVE, é uma das tecnologias que mais tem auxiliado na evolução desse processo, através da multiplicação de animais geneticamente superiores em menor tempo. (VARAGO *et al.*, 2008)

Com o avanço na metodologia da PIVE e a ampliação na produção e no comércio de embriões, aumentaram também as demandas por um aperfeiçoamento das metodologias de criopreservação desses embriões, permitindo o transporte a longas distâncias bem como o armazenamento por tempo indeterminado. A criopreservação ainda facilita o manejo nas propriedades, otimizando o uso de receptoras em um único trabalho, possibilitando concentrar os partos em épocas mais adequadas (RUMPF, 2007). A busca por embriões congelados tem aumentado e com ela o estudo em como melhorar a produção e a criopreservação dos embriões para que tenham menor dano nas estruturas celulares durante o processo e consequentemente

aumentar a taxa de prenhez que ainda é baixa quando comparada com os embriões transferidos à fresco (DODE *et al.*, 2013).

Segundo estudos, a maior quantidade de lipídios presente no citoplasma dos embriões *in vitro* os tornam mais sensíveis à criopreservação do que os embriões *in vivo* (ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006). Potenciais explicações para isso podem ser atribuídas ao meio em que os embriões são cultivados, principalmente em relação a quantidade de soro fetal bovino (SFB), e a eficiência das mitocôndrias embrionárias em metabolizar esses lipídios, resultando em maiores quantidades de lipídeos na membrana plasmática e no citoplasma das células embrionárias (SUDANO *et al.*, 2012).

Visando aumentar a produção de embriões de melhor qualidade, vários estudos têm traçado estratégias desde a aspiração folicular (*ovum pick-up* - OPU) com o intuito de aumentar o número e a qualidade dos complexos cumulus-oocitários (CCO's) (MONTEIRO *et al.*, 2017; WATANABE *et al.*, 2017). Exemplos destes estudos, destacam a utilização de hormônios foliculo estimulante (FSH) nas doadoras com objetivo de aumentar o número, diâmetro e a qualidade dos folículos com CCO's que resultarão em um maior número de embriões produzidos (VIEIRA *et al.*, 2014). A somatotropina bovina recombinante (rBST) que tem efeito sobre a competência e maturação oocitária (GONG *et al.*, 1997; ZHOU, *et al.*, 2000) e até mesmo as células troncos mesenquimais (MSC's), com suas características pró-regenerativas têm sido utilizadas para melhorar a taxa de recuperação e a qualidade dos oócitos aspirados visando melhorar a PIVE (SOARES *et al.*, 2018).

Algumas estratégias dentro do laboratório também têm sido aplicadas visando melhorar a produção dos embriões, tais como as mudanças na condição de cultivo e a utilização de alguns antioxidantes e reguladores de estresse com o objetivo de melhorar o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária (MICHALAK E GYE, 2015; LIN *et al.*, 2019).

2.2 Produção In Vitro De Embriões Bovinos

A aspiração folicular (*ovum pick up* – OPU) associada a fertilização *in vitro* (FIV) podem ser consideradas tecnologias consolidadas, e quando combinadas, é possível produzir mais de 50 bezerros por vaca doadora anualmente, embora esse número possa variar consideravelmente entre diferentes animais. A produção *in vitro* de embriões bovinos se divide em várias etapas (Figura 1) entre elas: aspiração folicular ou ovum pick up (OPU), maturação *in vitro* dos oócitos aspirados (MIV), fertilização *in vitro* dos oócitos maturados (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) por 6 a 7 dias até atingir o estágio de blastocisto, os quais serão

transferidos à fresco para receptoras previamente sincronizadas ou criopreservados para posterior transferência dos embriões (SOUZA-FABJAN *et al.*, 2014; MELLO *et al.*, 2016).

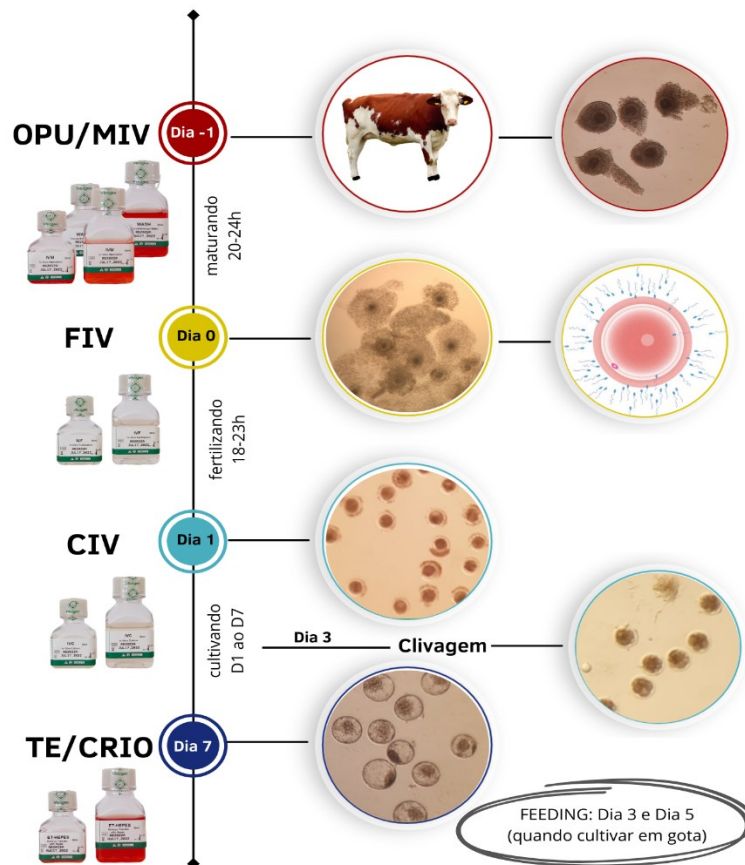


Figura 1. Esquema das etapas dos procedimentos de produção *in vitro* de embriões bovinos (OPU, MIV, FIV, CIV e CRIO/TE).

2.2.1 Ovum Pick Up (OPU)

A coleta de oócitos ou *Ovum Pick Up* (OPU) é uma etapa crucial, pois a qualidade dos oócitos afeta diretamente o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário. O primeiro bezerro gerado por FIV nasceu em 1981, e a técnica não cirúrgica de coleta de óvulos (OPU) para bovinos foi adaptada do procedimento utilizado em humanos em 1987. Desde então, houve um avanço significativo nas pesquisas voltadas para o aprimoramento dessas tecnologias para aplicação em bovinos (MULLIGAN *et al* 2018).

A OPU é uma técnica minimamente invasiva realizada com ajuda um equipamento de ultrassom com transdutor micro convexo de 5 MHz ou sonda convexa de ultrassom de 7,5 MHz. Além disso é conectado ao ultrassom, uma guia de aspiração e um dispositivo de aço inoxidável com uma agulha adaptada para vacas ou novilhas que permite a coleta de oócitos oriundos dos folículos antrais (> 2 mm de diâmetro). A visualização dos ovários é feita no monitor do ultrassom com precisão milimétrica. Durante o processo, uma agulha fina de 18 ou 20 G, guiada por imagens de ultrassom em tempo real é inserida no ovário da vaca para aspirar os oócitos dos folículos ovarianos. A agulha é conectada a um sistema de vácuo e o fluido folicular aspirado é enviado para um tubo através de uma linha de aspiração própria para OPU conectada em um tubo de centrifuga de 50ml contendo a solução de PBS, com uma pressão de vácuo ajustada entre 72 e 78 mmHg (Figura 2) (GARCIA *et al.*, 2013).



Figura 2- Bomba a vácuo para OPU, linha e sistema de aspiração completo mostrando o funcionamento durante uma aspiração.

Imediatamente após a anestesia epidural, o transdutor é inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação retal, os ovários são posicionados para obtenção de uma boa visualização dos folículos (Figura 3) a serem aspirados. Após a aspiração de todos os folículos em ambos os ovários da doadora, o tubo contendo PBS e o líquido aspirado, juntamente com os oócitos é levado para fazer a lavagem e seleção dos oócitos (MERTON *et al.*, 2013).

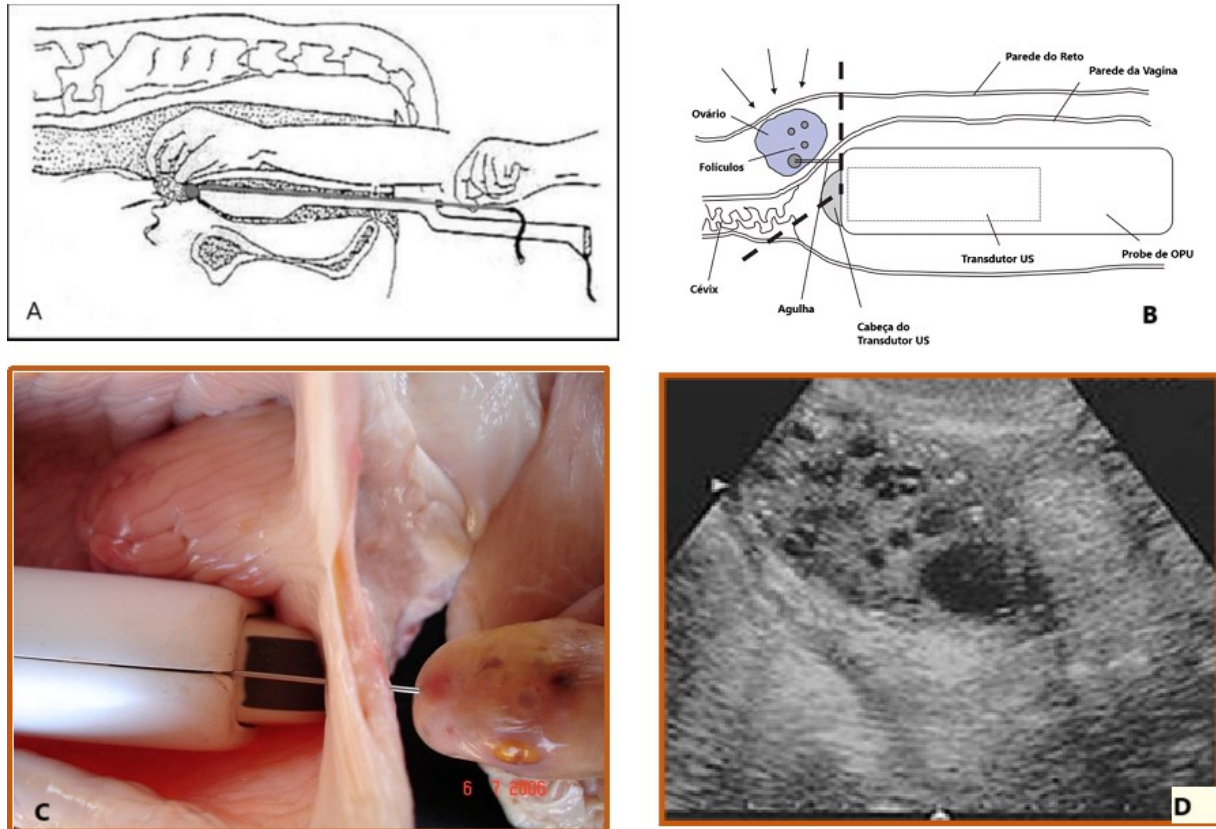


Figura 3-A) Esquematização da metodologia de Ovum pick up (OPU). B) Posição do transdutor do US, juntamente com a guia de OPU. C) Visualização do fundo da vagina do animal para a punção dos folículos no ovário. D) Visualização do ovário e folículos – imagem de US

2.2.2 Seleção dos Oócitos

Após a aspiração dos folículos, o tubo contendo o fluido folicular é filtrado em filtro de coleta de oócitos e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração e para lavar a agulha de OPU. O sedimento depositado no filtro é lavado e colocado em placa de *petri* para busca e recuperação de CCO's sob estereomicroscópio. Neste momento é efetuada a contagem e a avaliação dos oócitos quanto a qualidade (SENEDA *et al.* 2001; MOROTTI *et al.* 2014).

A qualidade intrínseca do oócito é um dos fatores mais determinantes para o sucesso do desenvolvimento embrionário inicial. Por essa razão, a seleção criteriosa dos oócitos é essencial para o sucesso da PIV. Em geral, a escolha dos oócitos é baseada em características morfológicas, que podem ser facilmente avaliadas por meio de microscopia de luz. Os oócitos são classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em Graus 1, 2 e 3 (G1, G2 e G3), oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atresícos (atr), conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1: Classificação do Complexo Oócitos Cumulus (CCO)		
Qualidade	Células do Cumulus	Ooplasma
GRAU 1	Tem mais de três camadas de células compactas cobrindo completamente a superfície da zona pelúcida (ZP)	É denso, e preenche todo o interior da ZP granulações finas e bem homogêneas
GRAU 2	Tem uma ou duas camadas células compactas cobrindo a superfície da ZP	É denso e preenche todo interior da ZP, mas pode apresentar algumas granulações no ooplasma como manchas
GRAU 3	Tem menos de uma camada celular que mal cobre a superfície da ZP	Apresenta manchas e o ooplasma as vezes é contraído
INVIÁVEIS	São desnudos, sem célula em volta da ZP ou apresenta células degeneradas como uma aglutinação	Cor clara, manchando, várias células degeneradas com vacúolos ou fragmentadas
Fonte: IETS Guidelines - outubro 2022		

Após selecionados e classificados, os CCO's são lavados e colocados em tubos de solução de TCM 199 (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco) para transporte ou são maturados in vitro em meio específico de maturação (MIV) com atmosfera gasosa e temperatura adequados até a realização dos próximos passos (SENEDA *et al.* 2003).

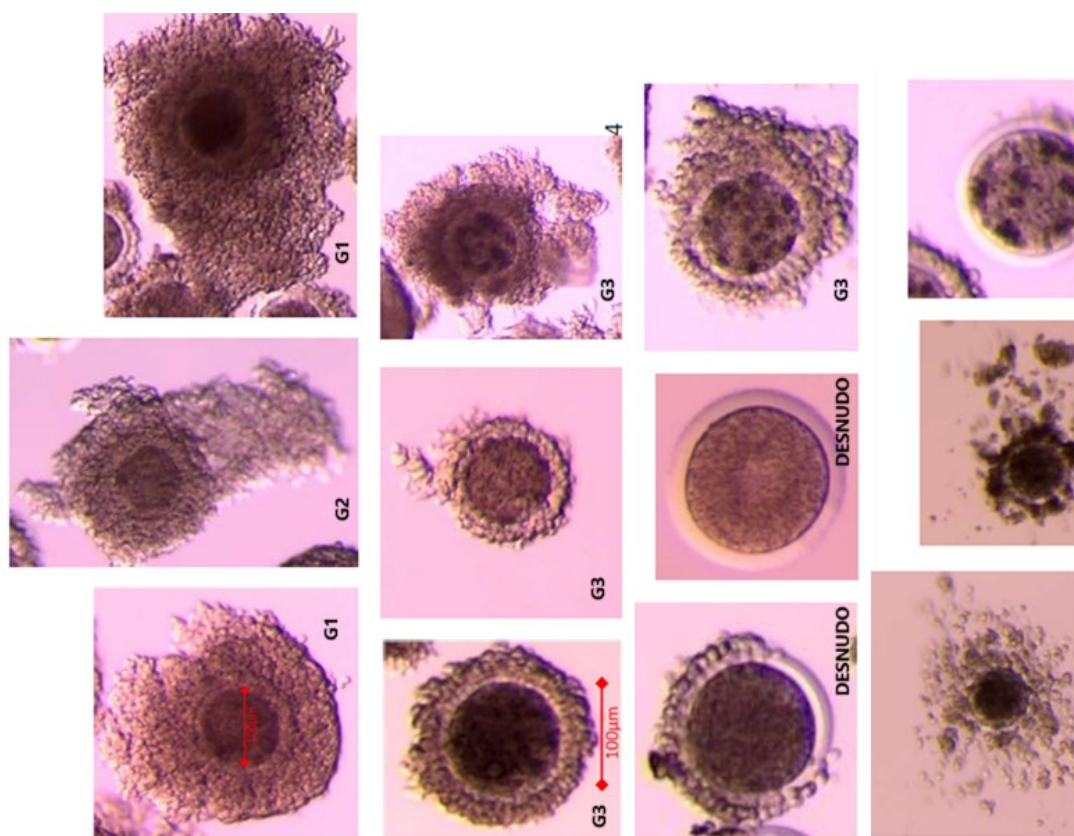


FIGURA 4.- IETS Guidelines para classificação de oócito – Outubro de 2022

2.2.3 Maturação in vitro (MIV)

Os folículos aspirados apresentam-se em diferentes estágios de desenvolvimento e os CCO's selecionados ainda não passaram pela maturação nuclear e citoplasmática, um processo essencial para que a fertilização ocorra. Portanto, a etapa de maturação in vitro (MIV) é considerada extremamente importante para o sucesso da produção de embriões (PONTES *et al.* 2011; MOROTTI *et al.* 2014).

Na maturação os CCO's passam por uma série de alterações nucleares e citoplasmáticas entre elas destacam-se: a maturação nuclear do oócito que é relacionado ao avanço da meiose, quando ele passa da prófase da primeira divisão meiótica para a metáfase da segunda divisão meiótica (MII), isso em uma condição natural ocorre próximo ao momento da ovulação. Simultaneamente à maturação nuclear, que se relaciona com uma série de modificações em organelas e proteínas que ocorrem no oócito, a maturação citoplasmática (HYTTEL *et al.*, 1997). Na MII a meiose é interrompida até a fertilização, e quando reativada resulta na segregação do segundo corpo polar (SIRARD, 2001).

Os processos de meiose e mitose que ocorrem durante a transição de oócito competente para zigoto são regulados por fosforilação e desfosforilação de proteínas e que envolvendo diferentes quinases e fosfatases (MILOVANOV & SIRARD, 1994; LEVESQUE & SIRARD, 1995). Sabe-se que durante a maturação os oócitos são dependentes de hormônios esteróides, de hormônios protéicos e fatores de crescimento que auxiliam em todo esse processo, quando serão ativados receptores presentes na membrana citoplasmática, que estimulará a formação intracelular de segundos mensageiros (BERRIDGE, 1985)

O processo de maturação oocitária tem o objetivo de mimetizar as condições fisiológicas do ovário, preparando o oócito para a fertilização. Essa é uma etapa crítica que influencia diretamente na qualidade dos futuros embriões. Por isso diversos fatores como hormônios, temperatura e oxigenação desempenham papéis essenciais para uma maturação adequada. O meio de maturação é normalmente suplementado com LH, FSH, aminoácidos, sais inorgânicos, FBS (soro fetal bovino) e vitaminas. A suplementação dos meios é amplamente pesquisada e está sempre em evolução para definir as condições ideais para o desenvolvimento dos embriões (ROSA *et al.* 2018; PIOLTINE *et al.* 2021).

O período de maturação dura aproximadamente 24 horas e é realizado em estufa com temperatura controlada de 38,5 °C em uma atmosfera umidificada e com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (CAVALIERI *et al.* 2018). A atmosfera ideal para o cultivo embrionário tem

provocado discussões ao longo dos anos. Em relação à tensão de O₂, a maioria dos laboratórios usa uma concentração de 20% a 5%, ou mesmo uma combinação de ambos em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (IVM e cultura in vitro (IVC), respectivamente) (HIRAO *et al.* 2012; BESSI *et al.* 2021).

2.2.4 - Fertilização in vitro (FIV)

Após a maturação, a próxima fase é a FIV propriamente dita, onde os oócitos são co-cultivados com espermatozoides. O dia da FIV é designado como Dia 0, e tem como objetivo promover um ambiente ideal para que os CCO's sejam fertilizados pelos para formação do zigoto. Os oócitos são colocados em gota de meio específico, cobertos com óleo enquanto o sêmen é preparado através de um processo de filtragem para remoção do diluidor e espermatozoides mortos (CROWE, LONERGAN E BUTLER 2021).

Para a FIV são usualmente utilizadas amostras de sêmen congelado de diferentes touros, conforme a escolha do dono das doadoras, que são geneticamente compatíveis com o melhoramento genético desejado. O sêmen utilizado durante a FIV nos laboratórios comerciais geralmente de animais coletados em central especializadas e regulamentadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária). O sêmen é preparado mediante a técnica de gradiente de Percoll para obtenção de espermatozoides móveis, separando estes do diluidor, plasma seminal e de parte de espermatozoides mortos. A concentração é ajustada para 1×10^6 spz/ml. O meio utilizado na fertilização *in vitro* geralmente é o meio Tyrode's modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10µg/ml de heparina. Os gametas permaneceram incubados em microgotas de 70 µl cobertas com óleo mineral, por 18-22 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

O efeito do touro na FIV pode ser considerado uma das causas da oscilação na produção final de blastocistos, inclusive com o mesmo touro de partidas de coletas diferente (SIQUEIRA *et al.* 2018). Algumas pessoas têm realizado pesquisas com o intuito de identificar características em células espermáticas que podem melhor desempenho na produção de embriões in vitro (BUCHER *et al.* 2019; KASIMANICKAM 2021).

2.2.5 - Cultivo embrionário in vitro (CIV)

O cultivo é a última etapa na produção de embriões *in vitro* e inicia-se logo após o tempo de incubação dos gametas para a fertilização. Após 18 a 22 horas da inseminação os possíveis zigotos são desnudados das células do *cumulus* com movimentos vigorosos da pipeta, e após a desnudação os oócitos, possivelmente fecundados, são lavados em gotas de meio de lavagem e então são transferidas para meio de cultivo coberto com óleo. Permanecendo cultivando por um período de 6 a 8 dias até os zigotos atingirem os estádios de blastocisto (BL).

Os zigotos fertilizados são cultivados neste meio especializado para embriões bovinos e durante essa etapa do cultivo, os embriões passam por várias divisões celulares até atingirem a fase de blastocisto, o tempo de cultivo é de 7 dias quando esses estarão prontos para serem transferidos ou criopreservados. Em geral, 20% a 40% dos prováveis zigotos cultivados atingirão o estágio de blastocisto. A clivagem é realizada no terceiro dia depois da FIV, chamamos de D3, é nesse dia contamos quantas estruturas estão clivadas (RIZOS *et al.*, 2008).

Várias metodologias, meios de cultura e condições atmosféricas já foram testadas ao longo do tempo para entender e proporcionar um ambiente capaz de aumentar a taxa de embriões produzidos (COSTA *et al.*, 2020). Ao final do cultivo, os embriões são avaliados subjetivamente quanto à sua qualidade, essa avaliação é para determinar quais embriões têm maior chance de prenhez na transferência para as receptoras ou mesmo para serem destinados à criopreservação. A qualidade embrionária pode ser analisada com base em características como a forma e expansão do embrião, compactação e volume do botão germinativo, também conhecido como massa celular interna e se há presença de células estruídas ou não. Nesta fase, os embriões são classificados em graus I, II ou III conforme Tabela 3. Os embriões de alta qualidade têm uma chance maior de implantação bem-sucedida após a transferência.

2.3 ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

2.3.1 Retículo Endoplasmático (RE)

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela localizada no citoplasma das células dos eucariontes que tem importantes funções como síntese de lipídios e proteínas, regulação e homeostasia celular, armazenamento de cálcio, entre outras, e todas elas estão ligadas diretamente ao sistema reprodutivo dos mamíferos (KHATUN *et al.*, 2020). A sobrevivência e

desenvolvimento de um embrião está diretamente ligado ao correto funcionamento do RE que em associação com o complexo de Golgi e as mitocôndrias são responsáveis pelo acúmulo de energia, síntese de fosfolípidios e formação de proteínas de membrana necessário durante vários processos de cada fase de desenvolvimento. Alguns fatores como variação ambiental, estresse térmico, tratamentos químicos entre outros podem interferir na homeostase do RE fazendo com que este não realize corretamente sua função, causando apoptose e degeneração das células, devido ao acúmulo de proteínas mal dobradas o que denominamos de estresse do RE (LATHAM, 2016; LIN *et al.*, 2019).

Tanto os oócitos quanto os embriões são muito sensíveis à fatores exógenos tais como temperatura, variação dos meios quanto a osmolaridade e pH, estresse oxidativo, exposição química, luminosidade, entre outros. Todos estes fatores podem induzir estresse de RE e consequentemente diminuem o potencial do embrião em se desenvolver devido a alterações genômicas e metabólicas (LANE *et al.*, 2005).

Pesquisas vem sendo realizadas em diferentes laboratórios para testar o uso de baixas concentrações de O₂ variando de 1,5 a 7%, e tem sido observado danos ao metabolismo celular, prejudicando o desenvolvimento do embrião (WHITTY *et al.*, 2021). Por outro lado, altas concentrações de O₂ resultam em um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção de ROS é um processo fisiológico, onde várias enzimas celulares e vias metabólicas, como a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, desenvolvem ROS, e seu aumento leva ao envelhecimento celular precoce (YONG *et al.*, 2020). Alguns fatores que podem aumentar os níveis de ROS, como alta tensão de oxigênio e excesso de glicose nos meios de cultura dos embriões, danificam o funcionamento das mitocôndrias e do retículo endoplasmático no transporte de proteínas e na homeostase do cálcio dentro da célula, o que pode desenvolver à fragmentação do DNA e levar a apoptose e, consequentemente, à morte do embrião (CHU *et al.*, 2013; LANDAU *et al.*, 2013; YOON *et al.*, 2014; CHIARATTI *et al.*, 2020; WHITTY *et al.*, 2021). Para diminuir os danos celulares, alguns moduladores desse estresse são adicionados ao meio de cultura como o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ácido fenilbutírico (PBA), salubrinal e outros (ZHANG *et al.*, 2012; PIOLTINE *et al.*, 2021). Estudos demonstram que o tratamento com TUDCA durante a maturação *in vitro* (IVM) de oócitos bovinos pode ter efeitos positivos. Uma concentração de 100 µM de TUDCA aumentou significativamente a taxa de maturação e diminuiu as espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos desnudados, além de apresentar um menor número de células apoptóticas em complexos cumulus-oócitos (COCs) maturados. Segundo KHATUN *et al.* (2020), O TUDCA durante o IVC diminuiu a produção

de ROS e os níveis de estresse de RE (reduzindo a expressão de GRP78, ATF4, ATF6, IER1 e sXBP1), bem como de genes pró-apoptóticos (CHOP e BAX), enquanto aumentou os níveis de glutathiona (GSH) e a expressão do gene antiapoptótico BCL27. Segundo BESSI *et al.*, 2021, outras estratégias que podem diminuir o estresse do retículo é o co-cultivo de embriões com células somáticas, diminuição da exposição do embrião à luz incandescente e também ajustes da tensão de O₂.

Vários estudos têm sido realizados como a morfocinética, conteúdo lipídico, reorganização de organelas e, o mais recentemente, a comunicação intercelular mediada por microvesículas estão sendo focos das últimas pesquisas para melhorar a qualidade na produção de embriões *in vitro* (CHIARATTI *et al.*, 2020; DE ÁVILA *et al.*, 2020; DE ANDRADE MELO-STERZA E POEHLAND, 2021; SUZUKI *et al.*, 2021). Sabe-se que uma qualidade inferior dos embriões produzidos *in vitro* deve-se em parte ao estresse de RE que interfere no processo de desenvolvimento dos oócitos na maturação e no desenvolvimento embrionário (LIN *et al.*, 2015). Segundo LATHAM (2016), o estresse do RE interfere diretamente no processo meiótico dos oócitos e no desenvolvimento embrionário pré-implantação, o que pode levar a perda embrionária precoce. É bem estabelecido que a qualidade embrionária de embriões *in vitro* quando comparado com embriões *in vivo* ainda é inferior, e que estes apresentam citoplasma mais escuro, zona pelúcida mais frágil e uma maior concentração de lipídios, o que prejudica no processo de criopreservação (ENGASHIRA *et al.*, 2019). O estresse no retículo endoplasmático (RE) acontece quando a quantidade de proteínas mal dobradas ultrapassa a capacidade do controle de qualidade do retículo endoplasmático (ERQC) e do sistema de degradação de proteínas do retículo endoplasmático (ERAD). Esse acúmulo prejudica as funções normais do RE e provoca uma reação celular conhecida como Resposta a Proteínas Não Enoveladas (UPR - Unfolded Protein Response) o que leva à redução da qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. A UPR é um mecanismo adaptativo que tem como objetivo reduzir o acúmulo de proteínas mal dobradas e restaurar a funcionalidade do RE. (KHATUN *et al.*, 2020 e LIN *et al.*, 2019) O tratamento com TUDCA tem o objetivo de aliviar o estresse do RE durante a PIVE para termos um melhor desenvolvimento embrionário, levando a produção de embriões mais resistentes e de melhor qualidade (PIOLTINE *et al.*, 2021). Segundo Dicks *et al.*, 2021 o TUDCA atua como um chaperonas químicas que ajudam a estabilizar e envelopar adequadamente as proteínas, contribuindo para homeostase do RE. Ele é capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos e embriões, aumentando a abundância de transcritos relacionados à atividade antioxidante, como CAT, GPX1 e HMOX16. O estresse

oxidativo pode induzir e ser uma consequência do estresse do RE, portanto, a redução de ROS pela TUDCA pode aliviar o estresse do RE. Nesse mesmo estudo de Dicks e colaboradores sugere que o TUDCA pode exercer efeitos nos embriões através da ligação aos receptores de ácido biliar acoplado a proteína G TGR5 que está localizada na membrana celular, sinalizando que a ativação dessa via é importante para redução do estresse do RE e também oxidativo.

2.3.2. Ácido tauroursodesoxicólico (TD)

A Ursodoxicoltaurina é o nome comum da forma farmacêutica do ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ele é um ácido também conhecido como taurursodiol. A TUDCA é um ácido biliar hidrofílico de ocorrência natural quando se tem a junção da taurina com o ácido ursodesoxicólico (UDCA). Os humanos têm apenas vestígios de ácido tauroursodesoxicólico, mas os ursos têm grandes quantidades de ácido tauroursodesoxicólico e ácido ursodesoxicólico na bile (HAGEY *et al.*, 1993; NUNES *et al.*, 2012). Já foi comprovado que a TUDCA é um eficiente aliviador do estresse do RE e que ela pode melhorar o desenvolvimento embrionário em várias espécies como camundongos (ZHANG *et al.*, 2012a; LIN *et al.*, 2015), suínos (ZHANG *et al.*, 2012b; KIM *et al.*, 2012) e até mesmo em bovinos (SONG *et al.*, 2011), diminuindo a apoptose celular.

LIN *et al.*, 2015, demonstraram em seus experimentos que o tratamento com TUDCA, não só melhorou o desenvolvimento dos embriões de camundongo, bem como houve um aumento significativo na taxa de prenhez e no número de animais nascidos vivos sem diferença de peso dos animais do grupo tratado em comparação com o grupo controle.

Alguns estudos já foram feitos em laboratório com embriões de outras espécies e até mesmo em bovinos com oócitos oriundos de abatedouro, onde o tratamento com TUDCA produziu maior número de blastocistos. Além disso, foi observado um aumento significativo no número de células dos embriões produzidos, como no experimento de Khatun *et al.*, 2020 onde os embriões foram tratados com TUDCA na concentração de 100µM durante a etapa de maturação, resultando na maior da taxa de clivagem dos embriões. Em 2021, Pioltine e colaboradores concluíram que a utilização de TUDCA na concentração correta aumenta a competência dos oócitos cultivados *in vitro*, mas apesar de vários estudos ainda pouco se sabe sobre o efeito e benefício do tratamento com a TUDCA em relação a taxa de prenhez e nascimentos de embriões de bovino.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito do tratamento dos embriões durante o cultivo *in vitro* com um atenuador de estresse do RE, o ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA), sobre a clivagem, a produção de blastocistos e consequentemente sobre a taxas de prenhez dos embriões transferidos à fresco em fêmeas receptoras.

3.2 - OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a taxas de clivagem no D3 com 72 horas após a FIV e averiguar se houve diferença estatística entre o grupo tratado com TUDCA e o grupo controle.
- Avaliar o efeito do tratamento com TUDCA em relação a taxa de embriões produzidos no dia da transferência (D7);
- Comparar a taxa de prenhez após 30 dias desses embriões transferidos em receptoras previamente sincronizadas, e avaliar se houve maior número de prenhez dos embriões que foram tratados com a TUDCA em comparação com o grupo controle.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Aspiração Folicular

Os oócitos foram aspirados através da técnica de OPU (*Ovum Pick UP*) que é a aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom com transdutor micro convexo de 5 mHz conectado a uma guia de aspiração adaptada para vaca e novilhas da empresa WTA (Watanabe Tecnologia Aplicada). Foram aspirados de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm que são os mais viáveis para o cultivo *in vitro*, (GONÇALVES *et al.*, 2002). As matrizes previamente

selecionadas por seus proprietários eram doadoras de raças variadas entre leite e corte. Durante a OPU os oócitos foram mantidos na temperatura média de 37,5 °C (graus Celsius) em tubos Falcon de 50 ml contendo meio PBS (solução salina tamponada com fosfato) onde foi adicionado 200 µl de heparina sódica (5.000 UI/ml) e eles foram direcionados para um laboratório móvel onde realizou-se a lavagem com a mesma solução de PBS passando esse líquido em um filtro de coleta de oócitos, e foram depositados em placas de petri onde se realizou a busca e seleção dos oócitos os quais foram classificados em Graus 1, 2 e 3 conforme quantidade de células do cumulus e qualidade do citoplasma, e estes são chamados de viáveis, e os desnudos e expandidos são chamados de inviáveis e são somados nos totais como descrito na Tabela 1 baseado no manual da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS).

Após a seleção foi realizada lavagem em três gotas de meio de lavagem (TCM 199 e suplementações), e foram transferidos para um microtubo de cultura celular de 1,2ml com rosca (WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada), contendo 500µl de meio de maturação (TCM 199 suplementado com 10% SFB) e cobertas com 300µl óleo mineral da empresa Irvine Scientific (Ref. 9305) próprio para ser utilizado nos processos de PIVE.

4.2 – Maturação *in Vitro*

Após a coleta e a seleção, os oócitos passam pela fase de maturação, onde, em condições controladas, são cultivados em meio TCM 199 suplementado com 10% SFB, 5µg/ml FSH, 50µg/ml LH e 01µg/ml de estradiol cobertas com óleo mineral, os oócitos permanecem nesse meio de maturação por 22 a 24 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar ou podem ficar na incubadora portátil LABMIX que mantém em baixa tensão de oxigênio e faz a troca gasosa a cada uma hora a uma pressão de 15 a 20 mmHg.

Os meios para todo o processo de maturação, fertilização e cultivo dos embriões foram adquiridos prontos e fracionados pela empresa VITROGEN de Cravinhos – SP. A TUDCA (Sigma T0266) foi adquirida da empresa Sigma Aldrich e foi fornecida pela Universidade Federal de Santa Catarina – Laboratório de Reprodução Animal (LAFRA). Os oócitos foram transportados até o laboratório através de uma incubadora portátil LABMIX da empresa WTA a qual realizava a troca da mistura de gás a cada uma hora (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂), mantendo os oócitos na temperatura de 38,5°C. Assim que chegavam ao laboratório os microtubos eram transferidos para incubadora a 38,5°C e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar, onde ficaram em processo de maturação por um período de 22 a 24 horas.

4.3 – Fertilização *In Vitro*

Após o período de maturação, os CCOs foram transferidos para gotas de 70µl de meio FIV (VITROGEN), sendo o meio Tyrode's modificado (TALP) suplementado com heparina (10µl/ml) e 44 µl/ml de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) para auxiliar na capacitação espermática. As placas de 5 poços foram preparadas com gotas de 70 µl de meio FIV e cobertas com óleo mineral e foram colocadas para estabilização por pelo menos 2 horas em incubadora em atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar a 38,5 °C antes de transferirmos os oócitos.

A fertilização dos oócitos foi realizada com sêmen congelado de touros escolhidos previamente pelos proprietários. Foi utilizado sêmen sexado para as raças de leite e sêmen convencional para as raças de corte. Todo sêmen passou pela técnica de purificação através do gradiente percoll que já vem previamente diluído da VITROGEN para separar os espermatozoides com boa motilidade e remover o diluidor e o plasma seminal. A fertilização dos oócitos foi realizada com a deposição de 10µl do sêmen (concentração de 1×10^6 espermatozóides/ml) em cada gota de 70µl na placa de 5 poços onde os oócitos já tinham sido transferidos, colocando em cada gota apenas os oócitos de uma doadora, até 25 oócitos por gota e se necessário dividimos a mesma doadora em mais de uma gota. A FIV foi realizada pelo co-cultivo dos oócitos juntamente com os espermatozoides em estufa à temperatura de 38,5 °C e atmosfera húmida com baixa tensão de oxigênio e controlada de 5% CO₂ onde ficaram por um período médio de 18-24 horas.

4.4- Cultivo Dos Embriões

Após o período de FIV, os supostos zigotos foram lavados em pelo menos três gotas, com movimentos vigorosos da pipeta para que ocorresse a remoção das células do *cumulus* e, posteriormente, transferidos para placas de 5 poços onde foram cultivados em 500µl de meio de cultivo *in vitro* da VITROGEN (CIV) que consiste em um meio que se assemelha ao oviduto (SOF) modificado e enriquecido com 2,5% de SFB e BSA (bovine serum albumin), aminoácidos e antibióticos e cobertos com óleo mineral e colocados em uma incubadora de bancada (EVE) da empresa WTA com atmosfera controlada de baixa tensão de oxigênio (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂) e temperatura de 38,5°C onde permaneceram por 7 a 8 dias ou até o dia de serem transferidos ou congelados.

4.5 – Tratamento com TUDCA

De acordo com a aptidão da raça, corte ou leite, as doadoras aspiradas foram divididas em dois grupos aleatoriamente e da forma mais homogênea possível. Para investigar os efeitos da TUDCA, que foi o agente atenuador do estresse do RE utilizado nos experimentos, oócitos aspirados foram divididos de forma homogênea e cultivados em meio CIV suplementando-se metade com TUDCA e a outra metade sem o tratamento, sendo o grupo controle. O tratamento com TUDCA (Sigma T0266) foi realizado durante o todo o período de cultivo na concentração de 100 μ M.

4.6 – Taxa De Clivagem e Classificação Dos Embriões

A taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 depois da fertilização (D3), dois dias depois que os zigotos entraram em meio de cultivo. No dia 6 (D6) de cultivo foi realizada uma previsão para sabermos quantos embriões teríamos no dia seguinte para transferência e no dia 7 os embriões que tinha atingido o estágio de Blastocisto e Blastocisto Expandidos. A classificação dos embriões foi realizada no sétimo dia (D7) após a fertilização quando esses embriões foram classificados por categoria de desenvolvimento e em grau de qualidade segundo classificação da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) descrita nos Quadros 2 e 3.

Os embriões de boa qualidade foram envasados em palhetas de 0,25 ml com meio de Transferência – TE Hepes[®] da empresa Vitrogen, colocados no Transportador de Embriões a uma temperatura de 36,5°C e enviado a campo para serem transferidos em receptoras previamente sincronizadas. Os embriões que não transferidos foram destinados à criopreservação utilizando-se o processo de congelamento lento, com etilenoglicol 1,8 M, no congelador EFT – 3002 produzido pela empresa norte americana Beltron[®], com curva de -6,5 °C a -35°C e queda de 0,5°C.

TABELA 2: Classificação dos Estágios de Desenvolvimento do Embrião

Mórula (MO)	Os blastômeros são compactados de modo que não podem ser contados. O espaço Peri vitelino (PV) ao redor do embrião é visível e a espessura da zona pelúcida (ZP) permanece inalterada em relação aos estágios anteriores de clivagem.
Blastocisto Inicial (Bi)	Uma pequena cavidade da blastocele é visível e ocupa menos da metade do volume do embrião. Na maioria dos casos, o espaço PV permanece ao redor do embrião que pode ou não tocar o ZP.
Blastocisto (BL)	A cavidade da blastocele ocupa pelo menos metade do volume do embrião. Pequenas quantidades de espaço PV podem permanecer ou pode ser completamente ocupado pelo embrião devido ao preenchimento da cavidade da blastocele. A espessura do ZP permanece inalterada em relação aos estágios anteriores de desenvolvimento.
Blastocisto Expandido (BX)	O embrião ocupa totalmente o espaço sob a zona pelúcida e nenhum espaço PV permanece. O volume da cavidade da blastocele deve ser maior que a massa celular interna (MCI), que deve ser compacta e bem visível. O ZP é mais fino que os estágios anteriores. Os blastocistos expandidos podem variar em diâmetro dependendo da expansão da cavidade da blastocele e pode ter um ZP bem fina.
Blastocisto Eclodindo (BN)	A ZP fina é rompida e o trofotoderma (TE) pode ou não estar saindo pela abertura. O ICM é compacto e facilmente identificável. Observou-se que alguns embriões produzidos <i>in vitro</i> eclodem sem afinamento do ZP, isto pode ser devido ao endurecimento da zona ou a danos sofridos durante o manuseio.
Blastocisto Eclodido (BE)	O blastocisto emergiu completamente do ZP. O TE parecerá irregular sem a presença de ZP. O ICM é compacto e fácil de identificar.

Fonte: Adaptado do Manual da IETS - outubro 2022

Os embriões Graus III e IV que não tiveram qualidade para transferir ou congelar permaneceram no meio de cultivo até o D8 e D9 quando avaliamos a eclosão dos embriões que sobraram na placa (GARCIA *et al.*, 2004). Alguns embriões são mais tardios, e apesar de apresentarem boa qualidade, só alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido no D8 ou D9, sendo esses considerados embriões de qualidade inferior (GALLI *et al.*, 2003). A taxa de produção total da doadora foi resultante do número de embriões transferidos à fresco mais o número de embriões congelados adicionados ao número de eclodidos que sobraram na placa, dando assim o total de embriões que cada doadora produziu por OPU.

TABELA 3: Classificação morfológica do Embrião Bovino Quanto ao Grau de Qualidade

Qualidade	Qualidade do Embrião
GRAU I (Qualidade Boa e Excelente)	Embriões sem defeito morfológica, podendo ter algumas células extrusadas ou discretas alterações, mas tem potencial para se desenvolver tanto fresco quanto ser congelado e tem seu estágio de desenvolvimento compatível com o período de cultivo.
GRAU II (Qualidade Regular)	Embriões com maior número de alterações morfológicas e extrusão celulares, mas tem pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostra bons sinais de desenvolvimento.
GRAU III (Qualidade Pobre)	Embriões com extrusões ou fragmentações celulares comprometendo mais de 50% da massa celular, dificultando a classificação das células viáveis. Seu potencial de desenvolvimento é significativamente reduzido.
GRAU IV (Degenerados)	Embriões com comprometimento da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados, apresentando sinais de degeneração celular, fragmentação e alteração de cor.

Fonte: IETS Guidelines - outubro 2022

4.7 – Taxa De Prenhez

Os embriões de boa qualidade (Grau I e Grau II) foram transferidos no dia 7 (D7) em receptoras previamente sincronizadas e o diagnóstico de prenhez foi realizada mediante exame de Ultrassom após 30 dias de transferência.

4.8 – Análise Estatística dos Dados

Os dados para a análise estatística foram obtidos das 419 OPU onde tivemos 6.861 totais, dos quais dividimos por aptidão leite e corte, e dentro de cada grupo tivemos um grupo controle e um grupo tratado. As análises estatísticas de clivagem, produção de embriões e prenhes foram realizadas através de teste *t student* utilizando o Software-R estatístico RStudio versão 4.1.1. Os dados foram testados para normalidade usando o teste Shapiro-Wilk e as diferenças foram consideradas significativas em $p \leq 0,05$. (RStudio Team, 2021). As taxas de prenhez foram avaliadas por teste de Qui-quadrado conforme procedimento do software JMP-SAS.

5. RESULTADOS

No experimento foram realizadas 419 sessões de OPU, sendo 184 em fêmeas da raça Holandesa e 235 de raças de corte entre elas Angus, Brangus, Braford, Charolês, Devon, Hereford, Santa Gertrudes, UltranBlack e Wagyu. As doadoras foram divididas por aptidão de leite e de corte, e dentro de cada aptidão divididas em grupo tratado e grupo controle. Do total de oócitos obtidos, 2.819 foram das vacas de leite da raça Holandesa, dos quais 1.473 foram tratados com a TUDCA e 1.346 oócitos no grupo não tratado. Os outros 4.042 oócitos foram obtidos de vacas das raças de corte onde 2.011 oócitos foram tratados com a TUDCA e 2.031 ficaram sem o tratamento sendo o grupo controle.

Nos 419 animais aspirados tivemos um total de 6.861 oócitos, média geral de $17,73 \pm 0,48$ oócitos/OPU dentre eles 9,63 eram de qualidade grau 1 e 2 com $7,43 \pm 0,31$ clivados e $3,59 \pm 0,17$ embriões por OPU. Como observa-se na figura 5, no grupo de leite e corte a média de oócito por OPU foi similar de $17,24 \pm 0,73$ e $17,48 \pm 0,72$. respectivamente.

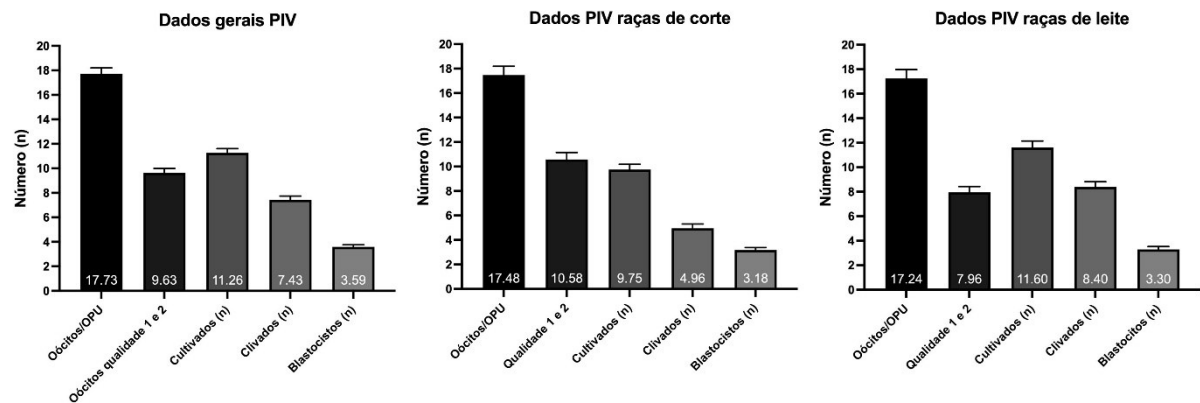


Figura 5 – Dados gerais da produção de todos os animais do experimento juntos e depois separado por aptidão corte e leite com a média de oócitos aspirados por OPU, oócitos grau 1 e 2, cultivados, clivados e produção de blastocisto demonstrados em número absoluto.

Houve diferença significativa entre as raças de corte e as raças de leite em relação ao número de oócitos de grau 1 (G1) e grau 2 (G2) como pode ser visto demonstrado na figura 6 os animais de corte apresentaram ($55\% \pm 0,02$) de oócitos G1 e G2, 5% a mais que os animais da raça de leite ($50\% \pm 0,02$). Nas raças leiteiras, os oócitos apresentaram qualidade inferior em comparação às raças de corte. Isso pode estar relacionado ao desafio metabólico associado ao período de lactação, uma vez que a maioria dos animais de leite estava em período de lactação.

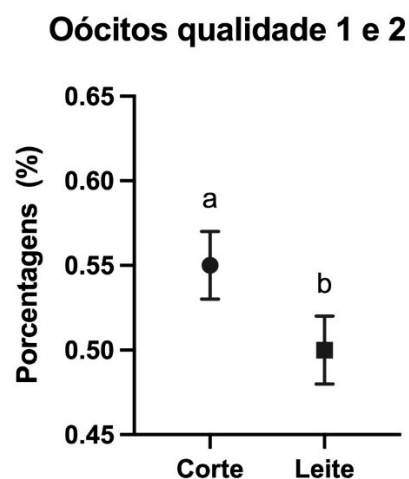


Figura 06 – Porcentagem de CCO's Graus 1 e 2 nas raças de leite e corte.

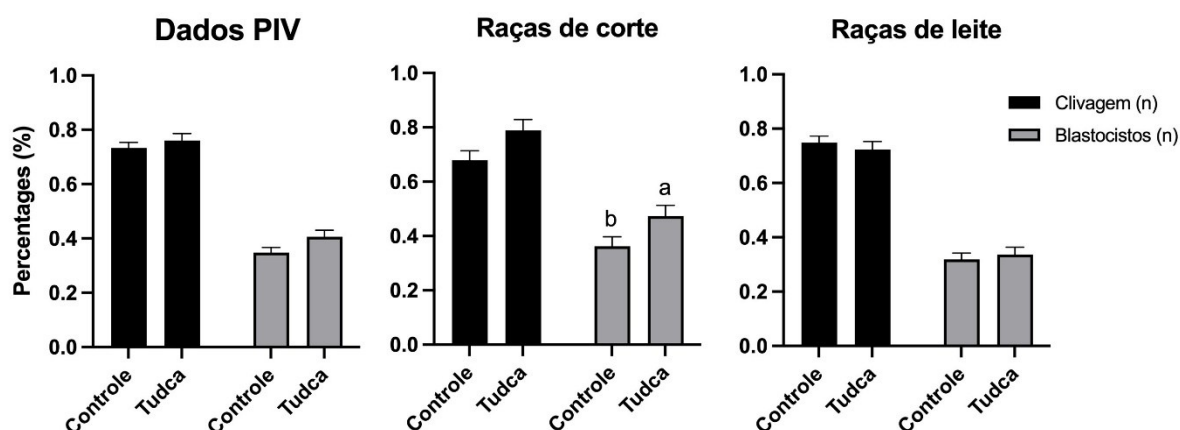


Figura 07 – Porcentagem de clivagem e produção de blastocisto em todos os animais juntos e diferenciando o grupo controle do tratado e depois separando por conte e leite, também grupo comparando grupo tratado e controle.

Ao avaliar a taxa de clivagem no D3, observamos que o grupo de leite apresentou taxas similares entre o grupo tratado ($72,4\% \pm 0,029$) e o grupo controle ($74,9\% \pm 0,024$), sem diferença significativa. Já no grupo de corte, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa, o grupo tratado apresentou uma taxa de clivagem ligeiramente superior ($78,9\% \pm 0,04$) em comparação ao grupo controle ($67,9\% \pm 0,035$). Ao todo, foram produzidos 1.481 embriões, avaliados nos dias 7 e 9 após a FIV. O grupo tratado com TUDCA apresentou uma taxa de blastocisto 5% maior por oócito total cultivado em relação ao grupo controle ($40,6 \pm 0,024\%$ e $34,8 \pm 0,019\%$, respectivamente; $P < 0,05$).

A produção de blastocistos foi numericamente maior no grupo tratado, tanto nas raças leiteiras quanto nas de corte. No entanto, a diferença estatística foi significativa apenas nos animais de corte. Nos animais de leite, a taxa de produção de blastocistos no grupo tratado foi de $33,6\% \pm 0,02$, enquanto no grupo controle foi de $31,9\% \pm 0,023$. Já nos animais de corte, o grupo tratado apresentou uma taxa de $47,3\% \pm 0,03$, significativamente superior à do grupo controle, que foi de $36,2\% \pm 0,03$ ($P < 0,05$).

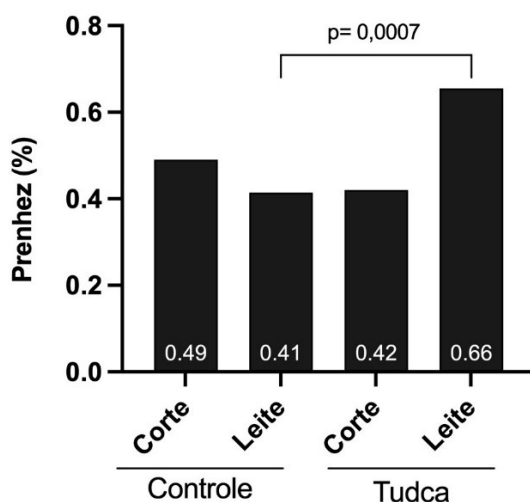


Figura 08 – Taxa de prenhez separando por leite e corte e também comparando grupo tratados com o controle.

No total, foram transferidos 448 embriões, resultando em 210 gestações diagnosticadas entre 30 e 45 dias após a transferência embrionária (TE). A taxa de prenhez no grupo de corte não apresentou diferença estatisticamente significativa. Foram realizadas 240 transferências, obtendo-se 108 prenhez, com uma taxa de 49,02% no grupo controle e 42,03% no grupo tratado. Entre os animais de leite, observou-se uma diferença estatística significativa. Dos 198 embriões transferidos, foram registradas 103 prenhez, sendo 46 (41,44%) no grupo controle e 57 (65,51%) no grupo tratado (figura 8).

6. DISCUSSÃO

Existem evidências de que fatores exógenos interferem na qualidade dos oócitos levando automaticamente a uma baixa qualidade dos embriões e na diminuição da quantidade de blastocistos produzidos, consequentemente menor taxa de prenhez (MELLO, 2016). Sabemos também que a qualidade do embrião *in vitro* ainda é inferior ao do embrião *in vivo*, em especial relativo as taxas de gestação e nascimentos devido a fatores ambientais, genéticos, metabólicos e hormonais nos oócitos, zigotos e/ou embriões (PONTES *et al.*, 2009). O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito do tratamento dos embriões durante o cultivo *in vitro* com o TUDCA que é um atenuador de estresse do RE, sobre a clivagem, a produção de blastocistos e consequentemente sobre a taxas de prenhez dos embriões transferidos à fresco.

A qualidade das Complexos Cumulus-Oócito (COCs) pode ser influenciada por diversos fatores, tanto intrínsecos quanto extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, destacam-se a raça, a

idade, o status reprodutivo, o estado metabólico e nutricional, os níveis hormonais e o estágio do ciclo estral (MOUSSA *et al.*, 2015). Já os fatores extrínsecos importantes o processo de aspiração, manipulação dos oócitos durante a seleção, e os métodos e meios utilizados na maturação das COCs, a temperatura de armazenamento, o meio de coleta e cultivo e as habilidades de micromanipulação do embriologista (TELLO *et al.*, 2020).

Na literatura, temos vários estudos que associam a nutrição adequada à qualidade oocitária, principalmente em vacas leiteiras e identificaram como causa principal o balanço energético negativo (MOREIRA *et al.*, 2000; LÓPEZ GATIUS *et al.*, 2002; CHAGAS *et al.*, 2007). A função reprodutiva em bovinos é extremamente influenciada pela nutrição, uma alimentação desbalanceada no consumo de energia e matéria seca pode levar a redução na qualidade de oócitos e embriões (NOLAN *et al.*, 1999; BOLAND *et al.*, 2001; SALES *et al.*, 2015).

No nosso experimento tivemos uma diferença significativa na qualidade dos oócitos entre as raças de corte e as raças de leite como pode ser observado em relação ao número de oócitos de grau 1 (G1) e grau 2 (G2) demonstrado na figura 05. Os animais de corte apresentaram ($55\% \pm 0,02$) de oócitos G1 e G2, 5% a mais oócitos de melhor qualidade que os animais de leite ($50\% \pm 0,02$). Observa-se também essa diferença na qualidade dos oócitos quando comparamos as raças zebuínas com as raças taurinas, estudos mostram que animais das raças *Bos indicus* com uma dieta de alta energia por um tempo prolongado tem a produção de embriões *in vitro* afetada comparada com animais que receberam uma dieta de manutenção, e que os oócitos de doadoras *Bos taurus* sofrem menos interferência da dieta com alta energia (SALES *et al.* 2015)

Outro ponto a ser discutido é o efeito da sazonalidade na produção e de embriões *in vitro* tanto nos parâmetros climáticos quanto dos nutricionais, a qualidade dos oócitos dependente da sazonalidade (FERNANDES *et al.*, 2001 e GAMA FILHO *et al.*, 2007). Estudos mostram que alterações celulares como diminuição da maturação nuclear, desorganização do citoesqueleto e apoptose, são vistos em animais em consequência de períodos de alta temperatura (MÁRQUEZ *et al.*, 2005). Além disso, no Brasil temos uma enorme variação durante o ano em relação à disponibilidade e qualidade dos alimentos, principalmente em sistemas de produção onde os animais são mantidos a pasto, como é comumente observado em grande parte do território brasileiro (DOURADO *et al.*, 2012 e FERREIRA *et al.*, 2014).

ROCHA *et al.* (2008), avaliando fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* onde foram realizadas aspirações durante o verão e inverno, foi detectado que as raças taurinas tinham uma menor

porcentagem de oócitos normais durante o verão em relação ao inverno, sendo que poucos embriões atingiram o estágio final de blastocisto, no entanto, para raças zebuínas, não houve diferença na porcentagem de oócitos normais ou na produção de embriões durante as diferentes estações do ano.

Foi observada uma grande variação na coleta dos complexos cumulus-oócito (CCOs) assim como produção de embriões *in vitro* entre as diferentes raças de bovinos. BARUSELLI et al., 2012 e SILVA et al., 2015 demonstram em seus estudos que as diferenças entre as raças e seus genótipos têm sido associadas ao número e à qualidade dos CCOs recuperados em cada sessão de aspiração. Fêmeas zebuínas, por exemplo, podem apresentar um maior número de oócitos recuperados, o que leva a um número superior de oócitos com potencial para seguir pelas etapas de maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro*, consequentemente maior número de embriões (PONTES et al., 2010; VIANA et al., 2018).

Segundo RIZO et al, 2008 a proporção de oócitos imaturos que atingem o estágio de blastocisto, raramente ultrapassa o limite de 30–40%, no entanto, observamos em nosso estudo taxas de produção média de 40,6% nos grupos tratados com a TUDCA, sendo 47,3% nos animais de corte e 33,6% nos animais de leite, sendo significativa a diferença em relação aos grupos não tratados, 31,9% para os animais de leite e 33,6% para os de corte dos grupos não tratados.

Segundo trabalho realizado por KHATUN et al., (2020), foi identificado um aumento na taxa clivagem e um melhor desenvolvimento dos embriões quando esses foram tratados com 100µM de TUDCA. Segundo PIOLTINE et al., (2021), o tratamento com a TUDCA atenua o estresse de RE primeiramente através da redução do estresse oxidativo, diminuindo significativamente a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) aliviava essa fonte de estresse do RE promovendo uma melhoria no desenvolvimento dos embriões., embora os resultados em relação de formação de blastocisto não tenham sido estatisticamente significativos neste estudo específico. Nesse mesmo trabalho de PIOLTINE e colaboradores o tratamento com TUDCA aumentou a abundancia de mRNAs de genes antioxidantes como CAT, GPX1 e HMOX1 nos oócitos, sendo esses genes importantes para o mecanismo de defesa antioxidante celular, ajudando a manter a homeostase em condições de elevados níveis de ROS.

Nossos dados demonstram uma maior produção de embriões nos grupos tratados tanto no leite quanto no corte, como já citado anteriormente, assim como melhor taxa de prenhez, nos animais de aptidão leiteira mesmo transferido em 6 diferentes propriedades, em protocolos diferentes e diferentes transferidores tivemos 57 prenhez de 87 transferidos, sendo 65,51% de

prenhez no grupo tratado e 46 prenhez de 111 transferido no grupo não tratado sendo 41,44%. Podemos atribuir essas melhores taxas de prenhez ao tratamento com a TUDCA como citado no trabalho de Yoon et al. 2014, os embriões suplementados com TUDCA no período de cultivo obtiveram um aumento no número de células, consequentemente melhorando o resultado destes nas taxas de prenhez.

Segundo trabalho realizado por TRENKEL *et al.*, 2022 onde 419 embriões provenientes de FIV foram transferidos com um resultado médio de 29,04% de prenhez, sendo 245 desses embriões de raças de corte que resultou em 29,92% de prenhez e 174 da raça Holandesa resultando em 27,81% de prenhez. Resultados foram observados também no trabalho de SCANAVEZ, CAMPOS E SANTOS (2013), que relataram uma taxa de gestação de 57,8% (636/1100) após 1100 transferências de embriões produzidos *in vitro* de doadoras das raças Gir e Holandesa, e da mesma forma, NIEMANN *et al.*, (2002), ao discutirem os avanços da produção de embriões *in vitro* (PIV) e da transferência de embriões, apresentaram taxas médias de gestação de até 50%.

NONATO JÚNIOR *et al.* (2004) compara programas de transferência de embriões (TE) *in vivo* e *in vitro*, relatando uma taxa de gestação de 35,5% (310/849) para embriões PIV e 46,5% (105/226) para transferências realizadas com embriões *in vivo*. Sabemos que embriões *in vitro* tem uma menor chance de prenhez comparando com embriões *in vivo* (PONTES *et al.*, 2011). Falhas no desenvolvimento, fatores ambientais, desordens metabólicas e hormonais nos zigotos, o cultivo embriões e uma receptora não bem escolhida são algumas das possíveis causas dessa diferença de resultado (LEROY *et al.*, 2015). A qualidade dos embriões está relacionada aos processos realizados durante as técnicas desde a OPU, maturação, fertilização *in vitro* e cultivo (COELHO *et al.*, 1998). No presente estudo, foi utilizado um atenuador de estresse do RE, pois sabe-se que o retículo endoplasmático (RE) regula a qualidade, o enovelamento das proteínas sintetizadas, que são transportadas para seus destinos celulares, mas aquelas mal enoveladas são direcionadas para o processo de degradação levando a morte celular. Quando o estresse no RE é intenso ou persistente, ativa-se vias de morte celular, que prejudicar o desenvolvimento embrionário.

Em geral, o grupo tratado apresentou maior produção de blastocisto por oócito aspirado, proporcionou maior número de gestações também aos 30 dias. Novos estudos e inovações precisam sempre ocorrer para podermos entregar um embrião de qualidade cada vez melhor e garantir uma alta taxa de prenhez.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que o tratamento com TUDCA proporcionou uma taxa de blastocistos 5% maior por oócitos cultivados em relação ao grupo controle, portanto o grupo tratamento com TUDCA teve um efeito positivo na produção e qualidade dos embriões. O resultando em relação a taxas de prenhez, no grupo de leite tratado com TUDCA também foi estatisticamente significativo sendo 65,51% enquanto o grupo controle foi de 41,44%. Sendo assim, pode-se concluir que o estresse do retículo endoplasmático interfere na produção dos embriões *in vitro*, contribuindo para uma baixa conversão de oócitos em blastocistos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

BARUSELLI, P.S.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L. DA G DA.; CATUSSI, B.L.C.; BAYEUX, B.M. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20\(RB813\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20(RB813).pdf). Acesso em: 08 out. 2023., 2019

BARUSELLI P, FERREIRA R, SALES J, GIMENES L, S'A FILHO M, MARTINS C, et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology** 2011;76:1583–93.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BÓ, G.A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reprod Domest Anim**, v.47, p.134-141, 2012.

BERRIDGE, M.J. The molecular basis of communication within the cell. **Scientific American**, v. 253, n. 3, p. 142-152, 1985.

BESSI, B.W.; BOTIGELLI, R.C.; PIERI, N.C.G.; et al. Cattle In Vitro Induced Pluripotent Stem Cells Generated and Maintained in 5 or 20% Oxygen and Different Supplementation. *Cells*. 2021;10(6):1531. <https://doi.org/10.3390/cells10061531>

BOLAND, M.P.; 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.

BUCHER, K.; MALAMA, E.; SIUDA, M.; JANETT, F.; BOLLWEIN, H. Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. **J Dairy Sci**. 2019;102(12):11652-11669. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16572>

CAVALIERI, F.L.B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M.; et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**. 2018;117:57-60.

CHAGAS, L.M.; BASS, J.J.; BLACHE, D.; BURKE, C.R.; KAY, J.K.; LINDSAY, D.R.; LUCY, M.C.; MARTIN, C.B.; MEIER, S.; RHODES, F.M.; ROCHE, J.R.; THATCHER, W.W.; 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.

COELHO, L. A., et al. (1998). Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, 35, (5).

COSTA C.B, LUNARDELLI P.A, FONTES P.K, et al. Influence of cAMP modulator supplementation of in vitro culture medium on *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**. 2020;141:134-141. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.007>

CROWE A.D, LONERGAN P, BUTLER S.T. Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds. **J Dairy Sci**. 2021;104(12):12189-12206. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20281>

DICKS N, GUTIERREZ K, CURRIN L, DE MACEDO M.P., GLANZNER W.G., MONDADORI R.G., MICHALAK M, AGELLON L.B., BORDIGNON V. Tauroursodeoxycholic acid/TGR5 signaling promotes survival and early development of glucose-stressed porcine embryos†. *Biol Reprod*. 2021 Jul 2;105(1):76-86. doi: 10.1093/biolre/ioab072. PMID: 33889948; PMCID: PMC8256098.

DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRICIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões produzidos in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim**. Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013.

DOURADO, A.P.; TORRES FILHO, R.A; CARDOSO, E.C.; SINEDINO, L.D.; GERHARDT, B.T.; GOULARD, I.L.; NOGUEIRA, L.A.G. 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.

EGASHIRA, J.; IHARA, Y.; KHATUN, H.; WADA, Y.; KONNO, T.; TATEMOTO, H.; YAMANAKA, K.I. Efficient in vitro embryo production using in vivo-matured oocytes from superstimulated Japanese Black cows. **Journal of Reproduction and Development** 65 183–190, 2019. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-155>

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, C. L.; VANDER ZWAAG, D. F.; FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.

FERNANDES, C.E.; DODE, M.A.N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.131-135, 2001.

FERREIRA, M.B.D; LOPES, B.C.; SOUZA, J.C.; PINTO, T.L.C.; LIMA, M.R.; LEMOS, F.O.; FERNANDES, L.O.; GARCIA, J.M. 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, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer

heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **J Dairy Sci**, v.94, p.2383-2392, 2011.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)

GAMA FILHO, R.V.; FONSECA, F.A.; UENO, V.G.; FONTES, R.S.; QUIRINO, C.R.; RAMOS, J.L.G. Sazonalidade na dinâmica folicular ovariana e produção embrionária em novilhas da raça Guzerá. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.422-427, 2007.

GARDNER, D. K., & WALE, P. L. (2013). Culture of Embryos in the Laboratory: Basic Principles and Methods. In **Assisted Reproductive Technologies: New Advances and Reproductive Health**. Springer, 47-68.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. In: **I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, PR. Anais... SIRAA: Londrina, p.223-230, 2004.

GARCIA, M. I., et al. (2013). "Oocyte collection and selection in bovine in vitro embryo production." **Theriogenology**, 80(5), 447-457.

GONÇALVES, L.R.L.; VIANA, J.H.M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, SP: Varela, 2002. p. 195-226.

GONG, J.G.; BAXTER, G. A. B.T.; 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.

GRIMARD B, MARQUANT-LEGUIENNE B, REMY D, RICHARD C, NUTTINCK F, HUMBLLOT P, PONTER 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.

HAGEY, L.R; CROMBIE, D.L.; ESPINOSA, E.; CAREY, M.C.; IGIMI, H.; HOFMANN, A.F. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. **Journal of Lipid Research**. November 1993 (11): 1911–7. doi:10.1016/S0022-2275(20)35109-9. PMID 8263415

HIRAO Y, SHIMIZU M, IGA K, TAKENOUCI N. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: constant low and high oxygen concentrations compromise the yield of fully grown oocytes. **J Reprod Dev**. 2012;58(2):204–211. doi:10.1262/jrd.11-132m

HYTTEL, P; FAIR, T; CALLESEN, H; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v 47, n 1, p. 23-32, Jan.1997.

JOHNSON, M. H., & MCCONNELL, J. M. (2004). Environment of Embryo Culture and Development: **A Review. Fertility and Sterility**, 81(3), 535-540.

KASIMANICKAM R. Utilization of sex-selected semen. **In Bovine Reproduction**, 2021. Wiley. 1000–10. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch79>.

KHATUN, H.; WADA, Y.; KONNO, T.; TATEMOTO, H.; YAMANAKA, K. I. Endoplasmic reticulum stress attenuation promotes bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction** v.159, p.361–370. doi: 10.1530/REP-19-0492, 2020. PMID: 31990669.

KHATUN, H.; IHARA, Y.; TAKAKURA, K.; EGASHIRA, J.; WADA, Y.; KONNO, T.; TATEMOTO, H.; YAMANAKA, K. I. Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos. **Theriogenology**. 2020 Jan 15;142:131-137. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.042. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31593880.

KIM, J.S.; SONG, B.S.; LEE, K.S.; KIM, D.H.; KIM, S.U.; CHOO, Y.K. Tauroursodeoxycholic acid enhances the pre-implantation embryo development by reducing apoptosis in pigs. **Reprod Domest Anim** 2012;47:791–8.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. **Reprod Fertil Dev**. v. 17, p.371–378, 2005.

LATHAM, K. E. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: A basis for intervention and improvement of outcomes. **Cell Tissue Res**. v. 363, p.159–167, 2016.

LEROY JL, VALCKX SD, JORDAENS L, DE BIE J, DESMET KL, VAN HOECK V, BRITT JH, MAREI WF, BOLS PE. Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical views on what we learned from the dairy cow model. **Reprod Fertil Dev**. 2015 May;27(4):693-703. doi: 10.1071/RD14363. PMID: 25690396.

LEVESQUE, J.T., SIRARD, M.A. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 1, p. 114-121, 1995.

LIN, C.C.; HSIAO, L.D.; CHO, R.L.; YANG, C.M. Carbon monoxide releasing molecule-2-upregulated ROS-dependent heme oxygenase-1 axis suppresses lipopolysaccharide-induced airway inflammation. **International Journal of Molecular Sciences** 2019. (<https://doi.org/10.3390/ijms20133157>)

LIN, T.; DIAO, Y.F.; KANG, J.W.; LEE, J.E.; KIM, D.K.; JIN, D.I. Tauroursodeoxycholic acid improves the implantation and live-birth rates of mouse embryos. **Reprod Biol** 2015;15:101–5.

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.

MÁRQUEZ, Y.C.; GALINA, C.S.; MORENO, N.T.L. 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.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; DE SOUSA, S.L.G.; DE MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões in vitro (PIVE). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.40, n.2, p.51-57, abr./jun. 2016.

MELLO, R. R. C., et al. (2016). Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 40, (2).

MERTON, J. S., et al. (2013). "Oocyte recovery, in vitro maturation, and embryo production from ovaries obtained at slaughter." **Theriogenology**, 80(1), 88-94.

MICHALAK, M.; Gye, M.C. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. **Clin Exp Reprod Med**. 2015; 42(1):1–7. <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.1.1> PMID: 25874167; PubMed Central PMCID: PMC4390675

MILOVANOV, C., SIRARD, M.A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n. 4, p. 819-827, 1994.

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

MOREIRA, F.; RISCO, C.; PIRES, M.F. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, v.53, p.1305-1319, 2000.

MOROTTI F, Sanches B.V, Pontes J.H, et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**. 2014;81(5):696-701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002>.

MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X.H.; ZENG, F. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**, 2015, 155, 11–27.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, p.1551-1562, 2006.

MULLIGAN, M. S., & O'Callaghan, D. (2018). In vitro embryo production in cattle: a review. **Animal Reproduction Science**, 194, 69-79.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A. *et al* Gene expression patterns in bovine *in vitro* – produced and nuclear transfer – derived embryos and their implications for early development. **Cloning and stem cells**, v.4, p.29-38, 2002.

NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R.T.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology**, v.50, p.1263-1274, 1999

NONATO JÚNIOR, I., et al. (2004). Produção de embriões em vacas nelore com a utilização associada de FIV e TE. *In*: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Tecnologia De Embriões, 18., 2004, Barra Bonita. *Anais... Barra Bonita: Acta Scientiae Veterinariae*, 32.

NUNES, A.F.; AMARAL, J.D.; LO, A.C.; FONSECA, M.B.; VIANA, R.J.; CALLAERTS-VEGH, Z. TUDCA, a bile acid, attenuates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta deposition in APP/PS1 mice. **Mol Neurobiol** 2012;45:440e54

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; DIAS MAZIERO, R.R.; CROCOMO, L.F.; ONA MAGALHAES, L.C.; RASCADO, T.S.; MARTINS, A; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, p.1-12, 2012.

PIOLTINE, E.M.; COSTA, C.B.; BARBOSA LATORRACA, L.; FRANCHI, F.F.; DOS SANTOS, P.H.; MINGOTI, G.Z.; PAULA-LOPES, F.F.; NOGUEIRA, M.F.G. Treatment of in vitro matured bovine oocytes with Tauroursodeoxycholic Acid modulates the oxidative stress signaling pathway. **Front Cell Dev Biol** 2021 9:623852. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623852>

PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**. 2009 Mar 1;71(4):690-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.031. Epub 2008 Nov 7. PMID: 18995895.

PONTES, J.H.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.; et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial 14 program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. 2011; 75(9):1640–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026> PMID: 21334055.

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. 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

RIZOS, D; CLEMENTE, M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or the absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology Reproduction**, v68, p.236-243,2003.

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.

RIZOS, D; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryos development and quality. **Reproduction Domestic Animal**, v 43, p. 44-50,2008.

ROCHA, D R da. Avaliação de estresse térmico em vacas leiteiras mestiças (*bos taurus* x *bos indicus*) criadas em clima tropical quente úmido no estado do Ceará. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROSA C.O, MARINHO L, DA ROSA P, et al. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reprod Domest Anim**. 2018;53(4):921-929. <https://doi.org/10.1111/rda.13189>

RUBIN, M.I.B. Twenty years history of the Brazilian Embryo Technology Society (1985-2005). **Acta Sci Vet**, v.33, p.35-54, 2005.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Rev Bras Zootec**, v.36, p.229-233, 2007.

SALES, J.N.S; IGUMA, L.T.; BATISTA, R.I.T.P; QUINTÃO, C.C.R.; GAMA, M.A.S; FREITAS, C; PEREIRA, M.M.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SOUZA, J.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal Dairy Science**, v.98, p.1-14, 2015.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SENEDA M.M, Esper C.R, Garcia J.M, Oliveira J.A, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, 2001;67(1 2):37-43. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00113-0)

SENEDA M.M, Esper C.R, Garcia J.M, et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**. 2003;59(5-6):1435-1440. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01188-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01188-3).

SIQUEIRA A.F.P, DE CASTRO L.S, DE ASSIS P.M, et al. Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good 2018;13(7):e0200273. for nothing. **Plos One**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200273>

SILVA, J.S.; BORGES, L.S.; MARTINS, L.E.L.L.; LIMA, L. A.; BARBOSA, Y.G.S.; SILVA, N.A.; BRITO, T.K.P. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos – revisão. **Nutri Time**, 2015. Viçosa, 12, (5).

SILVA, A.P.T.B.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção in vitro de embriões bovinos. **B Anim Husb**, v.72, p.51-58, 2015.

SOARES, J.G.; ROSSI, G.F.; BAYEUX, B.M.; MORAES, G.F.A.; ELLIFF, F.M.; WATANABE, Y.F.; MONTEIRO, F.M.; RODRIGUES, N.N.; SALES, J.N.S.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARUSELLI, P.S.; LO TURCO, E.G. Effect of stem cells application on the oocyte and embryo production of bovine females. **Animal Reproduction Science**, v.15, p.521, 2018.

SOUZA-FAJAN, J. M. G., et al. (2014). In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. **Theriogenology**, 81, (9).

SONG, B.S.; KIM, J.S.; YOON, S.B.; LEE, K.S.; KOO, D.B.; LEE, D.S.; et al. Inactivated Sendavirus-mediated fusion improves early development of cloned bovine embryos by avoiding endoplasmic-reticulum-stress-associated apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development** 2011;23:826–36.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; CROCOMO, L.F.; MAGALHAES, L.C.; JUNIOR, A.M.; MACHADO, R; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, p.1-8, 2012.

TELLO, M.F.; LORENZO, M.S.; LUCHETTI, C.G.; MARURI, A.; CRUZANS, P.R.; ALVAREZ, G.M.; GAMBAROTTA, M.C.; SALAMONE, D.F.; CETICA, P.D.; LOMBARDO, D.M. Apoptosis in porcine cumulus-oocyte complexes: Relationship with their morphology and the developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, 2020, 87, 274–283.

THIBIER, M. The 1997 Embryo Transfer Statistics from Around the World. **Embryo Transfer News**, v.16(4), p.24- 28, 1998.

TONER, M., & DEEVER, J. (2005). Cryopreservation of Mammalian Embryos: Advances and Future Directions. **Human Reproduction Update**, 11(6), 1-13.

TRENKEL, C.K.G; NETO, A.P.; CICHOSKI, L.F.; ROSIN, M.R.; CATTETAM, J. Pregnancy rate after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, e166111131002, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.31002>

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer News**, v.36(4), p.8-25, 2018.

VIANA, J. H. M., et al. (2019). Oocyte maturation and the impact of in vitro culture systems on oocyte quality. **Journal of Reproduction and Development**, 65(3).

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals World embryo industry grows despite the Pandemic. IETS Data Retrieval Committee (henrique.viana@embrapa.br) In: **Embryo Technology Newsletter**, v. 39, n.4, 2021.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B.M.; SILVEIRA, C.R.A.; MOREIRA, R.J.C.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. 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.

WATANABE, Y. F.; ACCORSI, MONICA ; WATANABE, M. R. ; DAYAN, A. ; MEIRELLES, F. V. . Aspecto Comercial de Embriões Bovinos Produzidos In Vitro. In: GONÇALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Org.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ed.São Paulo: editora Roca Ltda, 2008, v. , p. 293-301

WATANABE, Y.F.; SOUZA, A.H.; MINGOTI, R.D.; FERREIRA, R.M.; BATISTA, E.O.S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F.V.; NOGUEIRA, M.F.G.; FERRAZ, J.B.S.; BARUSELLI, P.S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, v.14, p.635-644, 2017.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C.A. Reduced GLUT1 expression in Igf1-/- 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.

ZHANG, J.Y.; DIAO, Y.F.; KIM, H.R.; JIN, D.I. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. **PloS one**. 2012a; 7(7):e40433. Epub 2012/07/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040433> PMID: 22808162; PubMed Central PMCID: PMC3396646.

ZHANG, J.Y.; DIAO, Y.F.; OQANI, R. K.; HAN, R. X.; JIN, D.I. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. **Biology of reproduction**. 2012b; 86 (4):128. Epub 2011/12/23. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095059> PMID: 22190710.