



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DA INJEÇÃO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA
INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI)**

ANA CAROLINE CHAVES VALL NICOLÁS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2024**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DA INJEÇÃO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA
INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI)**

ANA CAROLINE CHAVES VALL NICOLÁS

ORIENTADORA: DRA. MARGOT ALVES NUNES DODE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2024**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DA INJEÇÃO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA
INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI)**

ANA CAROLINE CHAVES VALL NICOLÁS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS Á OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (Embrapa-Cenargen)
(ORIENTADORA)**

IVO PIVATO, PhD (Universidade de Brasília - UnB)

JOSÉ FELIPE WARMLING SPRÍCIGO, PhD (Universidade Federal de Goiás - UFG)

BRASÍLIA/DF, 04 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram de maneira significativa para a realização deste trabalho:

À Deus, a força maior que me conduz e ilumina os meus caminhos.

À minha querida orientadora, Dra Margot Alves Nunes Dode, por todo suporte, ensinamentos e inspiração ao longo deste processo. Sua paciência e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e ao meu noivo, pelo apoio emocional e incentivo constante ao longo da minha jornada acadêmica. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

Aos colegas do LRA, pela troca de experiências, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada muito mais leve.

Aos colaboradores e participantes deste estudo, cuja contribuição foi essencial para a coleta e análise dos dados.

À Universidade de Brasília, pelo excelente curso oferecido.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), por fornecer os recursos financeiros necessários para a realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder uma bolsa de estudos.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal ao longo deste processo.

Obrigada a cada um de vocês!

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
CAPÍTULO 1	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo Geral	2
1.1.2 Objetivos Específicos	3
1.2 Hipótese.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Produção de Embriões Bovinos	4
2.1.1 SOV	4
2.1.2 PIVE	8
2.1.3 TIFOI.....	12
2.1.4 Fatores que podem afetar a eficiência da TIFOI	16
2.1.4.1 Qualidade dos Ovócitos.....	16
2.1.4.2 Condições de Injeção.....	18
2.1.4.3 Maturação ovocitária	20
2.1.4.4 Ovulação.....	22
2.1.4.5 Transporte de gametas e embriões	23
3 REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2	37
RESUMO	38
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Animais.....	44
2.2 Delineamento experimental.....	45
2.2.1 Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos após a TIFOI in vitro	45
2.2.2 Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI.....	47

2.3	Avaliação das agulhas a serem testadas	47
2.4	Obtenção de Ovócitos Imaturos	48
2.5	TIFOI em ovários de abatedouro	49
2.5	Protocolo de sincronização de estro das ovuladoras	50
2.6	TIFOI.....	51
2.7	Coleta de embriões	52
2.8	Maturação in vitro (MIV)	53
2.9	Fecundação in vitro (FIV)	53
2.10	Cultivo embrionário in vitro (CIV)	54
2.11	Avaliação do diâmetro dos embriões e contagem do número total de células	54
2.12	Análise estatística	55
2.12.1	Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos após a TIFOI in vitro	55
2.12.2	Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI.....	56
3	RESULTADOS	57
3.1	Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos na TIFOI in vitro	57
3.1.1	Medições das Agulhas	57
3.1.2	TIFOI em ovários de abatedouro.....	58
3.2	Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI.....	62
3.2.1	Resposta ao protocolo de sincronização de estro	62
3.2.2	TIFOI e coleta de embriões	62
3.2.4	Avaliação do diâmetro dos embriões e contagem do número total de células	67
4	DISCUSSÃO.....	69
5	CONCLUSÃO	74
6	REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Este estudo investigou se as condições da injeção afetam a eficiência da TIFOI e a recuperação final de embriões. Na primeira etapa, testou-se quatro tipos de agulhas (27G Gengival (27G G), 27G WTA® (27G W), 27G Raquidiana (27G R) e 30G Gengival (30G G); dois volumes de meio PBS (10 e 20 μ l) e duas quantidades (25 e 50) de complexos cumulus-ovócitos (CCOs), utilizando ovários de abatedouros. Avaliou-se a resistência na penetração do folículo, o refluxo após a injeção, a porcentagem de CCOs retidos no sistema e as taxas de recuperação e de desnudamento dos CCOs após a aspiração do folículo injetado. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando o software SAS (9.4). As agulhas 27G R e 27G W apresentaram menor taxa de desnudamento ($P \leq 0,05$), comparada as demais. Entretanto, quando essas foram comparadas entre si, menor taxa de desnudamento ($P \leq 0,05$) foi observada com a 27G R. Além disso, com esta agulha houve maior taxa de recuperação ($P \leq 0,05$) com 10 μ l (85,82%) do que com 20 μ l (70,05%). Posteriormente, avaliou-se in vivo a agulha 27G R com 25 (tratamento T25) ou 50 CCOs (T50), em 10 μ l de PBS. A qualidade da injeção foi classificada em graus de 1 (melhor) a 3 (pior). Simultaneamente, grupos de 25 a 30 CCOs foram destinados à produção in vitro de embriões. Nove dias após a TIFOI, foi realizada a lavagem uterina das fêmeas ovuladoras. Os embriões produzidos pela TIFOI e in vitro (PIV) foram avaliados quanto ao diâmetro e número de células. O modelo GLM binomial foi ajustado e calculou-se as razões de chance dos tratamentos e graus de qualidade da injeção para a recuperação de estruturas e de embriões. Os dados de diâmetro e número de células embrionárias foram analisados por ANOVA. A quantidade de CCOs injetados não afetou a recuperação de estruturas ou embriões após a TIFOI ($P > 0,05$), mas as chances de recuperação de embriões foram maiores ($P \leq 0,05$) com injeções de grau 1 do que com injeções de grau 2. Os embriões TIFOI e PIV apresentaram diâmetro e número de células semelhantes ($P > 0,05$). Conclui-se que agulha 27G R com 10 μ l é a mais recomendada para a TIFOI, pois apresenta altas taxas de recuperação, com maior preservação dos CCOs. Além disso, as chances de

recuperação de embriões são afetadas pela qualidade da injeção, mas não pela quantidade de CCOs injetados.

Palavras-chave: Injeção; Folículo; Embriões bovinos; Complexo cumulus-ovócito.

ABSTRACT

This study investigated whether injection conditions affect the efficiency of IFIOT and the final embryo recovery. In the first stage, four types of needles (27G Gengival (27G G), 27G WTA® (27G W), 27G Raquidiana (27G R), and 30G Gengival (30G G); two volumes of PBS medium (10 and 20 μ l) and two amounts (25 and 50) of cumulus-oocyte complexes (COCs) were tested using ovaries from slaughterhouses. Resistance during follicle penetration, reflux after injection, the percentage of COCs retained in the system, and the rates of recovery and denudation of COCs after follicle aspiration were evaluated. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SAS software (9.4). Needles 27G R and 27G W showed lower denudation rate ($P \leq 0.05$) compared to others. However, when these needles were compared between each other, lower denudation rate ($P \leq 0.05$) was observed with 27G R. Additionally, with this needle, there was a higher recovery rate ($P \leq 0.05$) with 10 μ l (85.82%) than with 20 μ l (70.05%). Subsequently, needle 27G R was evaluated in vivo with 25 (T25 treatment) or 50 COCs (T50) in 10 μ l of PBS. The injection quality was classified into grades from 1 (best) to 3 (worst). Simultaneously, groups of 25 to 30 COCs were allocated for in vitro embryo production. Nine days after IFIOT, uterine flushing of ovulating females was performed. Embryos produced by IFIOT and in vitro (IVP) were evaluated for diameter and number of cells. The binomial GLM model was adjusted, and odds ratios of treatments and injection quality grades for structure and embryo recovery were calculated. Embryonic diameter and number of cells data were analyzed by ANOVA. The number of injected COCs did not affect structure or embryo recovery after IFIOT ($P > 0.05$), but the odds of embryo recovery were higher ($P \leq 0.05$) with grade 1 injections than with grade 2 injections. IFIOT and IVP embryos showed similar diameter and number of cells ($P > 0.05$). It can be concluded that the 27G R needle with 10 μ l is the most recommended for IFIOT, as it presents high recovery rates with greater preservation of COCs. Furthermore, the odds of embryo recovery are affected by injection quality but not by the quantity of injected COCs.

Keywords: Injection; Follicle; Bovine embryos; cumulus-oocyte complex.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ovuladoras utilizadas no Experimento 2 - Animais mestiços de raças leiteiras do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL). ..45
- Figura 2.** Esquema representativo do experimento 1.46
- Figura 3.** Medição do diâmetro interno e externo da agulha utilizando a ferramenta integrada à câmera.....48
- Figura 4.** Agulhas utilizadas no Experimento 1.....49
- Figura 5.** Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) antes e após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI).....50
- Figura 6.** Estruturas recuperadas após a lavagem uterina de fêmea bovina submetida à Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI)..... 53
- Figura 7.** a) Medição do diâmetro embrionário utilizando a ferramenta integrada à câmera. b) Embrião bovino corado com Hoechst 33342 para contagem do número total de células (núcleos azuis)..... 55
- Figura 8.** a) Razões de chance (odds ratio) dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2 sobre a recuperação total de estruturas após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). b) Taxa de recuperação total de estruturas dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2.....65
- Figura 9.** a) Razões de chance (odds ratio) dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2 sobre a recuperação total de embriões após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). b) Taxa de recuperação total de embriões dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2.....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Medidas médias de diâmetro externo, diâmetro interno, comprimento e capacidade de líquido comportado em diferentes agulhas.....57
- Tabela 2.** Resultados do teste preliminar avaliando o efeito de diferentes volumes de meio PBS sobre a recuperação e desnudamento dos complexos cumulus-ovócitos (CCOs) após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) (8 injeções/tratamento).....58
- Tabela 3.** Eficiência de diferentes agulhas utilizadas para a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) com 25 complexos cumulus-ovócitos (CCOs), em 20 μ l de meio PBS (5 injeções/tratamento).....59
- Tabela 4.** Efeito da interação entre diferentes agulhas (27 G R e 27G W) e volumes de meio veículo (10 e 20 μ l) na eficiência da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 14 injeções/tratamento.....60
- Tabela 5.** Efeito da interação entre diferentes agulhas (27 G R e 27G W), volumes (10 e 20 μ l) e quantidades (25 e 50) complexos cumulus-ovócitos (CCOs) na eficiência da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 7 injeções/tratamento.....61
- Tabela 6.** Taxa de retenção de complexos cumulus-ovócitos (CCOs) no sistema utilizando 25 (T25) ou 50 CCOs (T50) para a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 3 réplicas.....63
- Tabela 7.** Recuperação de estruturas totais e estruturas extras após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) em grupos de 25 (T25) ou 50 (T50) complexos cumulus-ovócitos (CCOs) e com injeções classificadas como 1 (boa) ou 2 (regular), em 3 réplicas.....64
- Tabela 8.** Resultados das razões de chance (*odds ratio*) para os pares de combinação de tratamento (T25 ou T50) e qualidade da injeção (1 ou 2) com base no Modelo GLM (regressão logística) ajustado para os dados da amostra.....67
- Tabela 9.** Produção *in vitro* de embriões a partir de complexos cumulus-ovócitos (CCOs) obtidos de ovários de abatedouro e utilizados como controle, avaliados nos dias (D) 2, 7 e 8 de cultivo.....67
- Tabela 10.** Média do diâmetro e do número total de células de embriões produzidos *in vivo* após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) ou *in vitro* (PIV), em estágio de blastocisto expandido, no 8º dia do desenvolvimento.....68

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as biotécnicas disponíveis para otimizar o uso do genótipo das fêmeas, a produção in vivo de embriões após superestimulação ovariana pelo uso de hormônios (SOV) e a produção in vitro de embriões (PIVE) associada à aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (Ovum Pick-Up: OPU) são as opções mais viáveis, pois ambas permitem aumentar o número de produtos anuais que uma fêmea pode ter.

A SOV apresenta como principais vantagens a qualidade dos embriões, os quais possuem maior capacidade de estabelecer e manter uma gestação, maior crioresistência, e o menor custo com infraestrutura, pois dispensa o uso de laboratórios (Mikkola et al., 2019). Entretanto, uma das suas principais limitações reside na imprevisibilidade e variabilidade da resposta superovulatória, observadas desde o estabelecimento dos primeiros programas de TE (transferência de embriões) comercial na década de 70 (Hasler, 2014; Mikkola et al., 2019). Além disso, é necessário respeitar um intervalo de cerca de 28 a 30 dias entre as administrações do hormônio folículo estimulante (FSH), restringindo o número de coletas que se pode realizar em um determinado período de tempo. Esse intervalo é necessário para que haja o reestabelecimento dos padrões endócrinos e a manutenção correta das ondas foliculares (Bó & Mapletoft, 2014).

Na PIVE, diferente da SOV, a coleta de ovócitos por OPU pode ser realizada semanalmente, sem alterar a atividade reprodutiva (Pieterse et al., 1988). Entretanto, além de a técnica exigir altos investimentos em infraestrutura laboratorial, apenas 30 a 40% dos ovócitos atingem o estágio de blastocisto (Lacerda et al., 2020; Leme et al., 2020; Mendonça et al., 2022). Além disso, os embriões produzidos in vitro (PIV) apresentam diferenças em relação aos seus homólogos in vivo em termos de crioresistência (Fair et al., 2001), ultraestrutura (Crosier et al., 2001; Lonergan et al., 2006) metabolismo (Khurana & Niemann, 2000) e expressão gênica (Mundim et al., 2009; Machado et al., 2013; Noguchi et al., 2020; Leme et al., 2021) bem como a incidência de anormalidades cromossômicas (Lonergan et al., 2004). Consequentemente, os embriões PIV, devido a sua menor qualidade, apresentam menor

capacidade de desenvolvimento após a TE, e apenas 27% dos embriões transferidos chegam a termo (Ealy et al., 2019).

Recentemente, a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) surgiu como uma alternativa aos sistemas utilizados até o momento para a produção de embriões (Sprícigo et al., 2016). Dentre as vantagens desta técnica, destaca-se o fato de que ela dispensa o uso de hormônios superestimulantes e a onerosa estrutura laboratorial da PIVE, utilizando o trato genital feminino para maturação ovocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. A técnica é realizada em um sistema inteiramente in vivo, beneficiando-se dos eventos fisiológicos da fêmea para a produção de embriões e eliminando os fatores que interferem diretamente na qualidade dos embriões PIV (Hoelker et al., 2017; Sprícigo & Dode, 2017).

Todavia, os resultados obtidos até o momento não são satisfatórios para seu uso em escala comercial, pois a taxa de embriões recuperados a partir do total de ovócitos injetados é muito baixa, situando-se em torno de 10 a 12% (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Andrlíkova et al., 2020). Portanto, para que a TIFOI possa ser utilizada comercialmente, é essencial que se torne mais eficiente, ou seja, que se aumente o número de embriões produzidos e recuperados. Os fatores responsáveis pelos resultados insatisfatórios obtidos até o momento ainda não estão esclarecidos, sendo importante avaliar todas as etapas envolvidas para que se possa identificar as que mais impactam negativamente a produção e recuperação final dos embriões.

Nesse contexto, o presente estudo tem como foco avaliar o efeito de diferentes condições de injeção, variando o tipo de agulha, o volume de meio e o número de estruturas, na taxa de recuperação embrionária.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi determinar as condições de injeção mais adequadas para aumentar a eficiência da técnica de TIFOI.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a partir de testes in vitro se o tipo de agulha, o volume de meio e a quantidade de ovócitos utilizados afetam a porcentagem de ovócitos que permanecem dentro do folículo e a sua qualidade;
- b) Determinar in vitro qual o tipo de agulha, a quantidade de ovócitos e o volume de meio mais adequado para a TIFOI;
- c) Avaliar se os parâmetros estabelecidos in vitro aumentariam a taxa de recuperação de estruturas e de embriões após a TIFOI;
- d) Avaliar se a qualidade da injeção afeta a taxa de recuperação de estruturas e de embriões após a TIFOI.

1.2 Hipótese

O tipo de agulha, o volume de meio, a quantidade de ovócitos utilizados e a qualidade da injeção afetam a eficiência da técnica de TIFOI e a recuperação final de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de Embriões Bovinos

2.1.1 SOV

A fêmea bovina é monoovulatória, o que implica na ovulação de apenas um folículo, com a liberação de apenas um ovócito durante cada ciclo estral (Hafez et al., 2004). Portanto, visando aumentar a produtividade de uma fêmea foi desenvolvida a técnica corriqueiramente denominada produção in vivo de embriões ou transferência de embriões. Essa técnica consiste em estimular hormonalmente os ovários de uma doadora, induzindo o desenvolvimento e ovulação de múltiplos folículos simultaneamente, com a liberação de vários ovócitos. Esses animais são submetidos à inseminação artificial (IA) e sete dias depois é realizada a lavagem uterina para coleta dos embriões. Os embriões coletados são então transferidos para vacas receptoras ou criopreservados, proporcionando uma alternativa para multiplicar rapidamente fêmeas de alta qualidade genética (Bó & Mapletoft, 2014).

A primeira transferência bem-sucedida de embriões em mamíferos foi relatada por Heape, que transferiu dois embriões de coelho angorá, compostos por quatro células cada, para uma corça belga inseminada, que posteriormente deu à luz quatro filhotes belgas e dois angorás (Heape, 1891). Conforme documentado por Betteridge (1981), não houve mais registros de quaisquer sucessos em transferências de embriões até a década de 1920. Foi nesse período que diversos pesquisadores novamente documentaram êxitos em transferências de embriões em coelhos. Warwick e colaboradores realizaram um considerável trabalho sobre a TE em ovelhas e cabras nas décadas de 1930 e 1940 (revisado por Betteridge, 1981). Já em bovinos, Umbaugh (1949) foi quem relatou as primeiras transferências bem-sucedidas de embriões. Esse autor obteve quatro gestações a partir da transferência de embriões bovinos. No entanto, todas as receptoras abortaram antes do nascimento dos animais. Em 1951, nasceu o primeiro bezerro

resultante da transferência de embriões bovinos, em Wisconsin, por meio da transferência cirúrgica de um embrião de cinco dias, proveniente de um abatedouro (Willett et al., 1951).

A indústria de TE comercial, tal como conhecemos hoje, surgiu na América do Norte no início década de 1970, como uma solução eficaz para acelerar a multiplicação animal (Betteridge, 2003). Inicialmente, as recuperações e transferências de embriões eram realizadas cirurgicamente com a exposição do útero e ovários, com a doadora sob anestesia geral. A introdução de técnicas não cirúrgicas de recuperação de embriões ocorreu na metade da década de 1970 (Drost et al., 1976; Elsdén et al., 1976) e de transferência no início da década de 1980 (Rowe et al., 1980), possibilitando a expansão da TE no setor produtivo e a criação do comércio de embriões/prenhez, tal como conhecemos hoje.

Dois tipos distintos de preparações de gonadotrofinas têm sido frequentemente utilizados para induzir superestimulação em vacas: gonadotrofinas provenientes de extratos de hipófise suína ou de outros animais domésticos e a gonadotrofina coriônica equina (eCG), anteriormente conhecida como gonadotrofina coriônica da água prenhe (PMSG) (Mapletoft et al., 2002). A gonadotrofina da menopausa humana (hMG) também resultou em uma resposta superovulatória comparável aos extratos hipofisários (Mcgowan et al., 1985). No entanto, o custo mais elevado da hMG e a falta de uma vantagem substancial limitou seu uso na indústria de transferência de embriões em bovinos.

Durante o desenvolvimento da indústria moderna de TE na década de 1970, a principal gonadotrofina utilizada para induzir a superovulação em bovinos era a eCG (Betteridge, 1977). A eCG é uma glicoproteína complexa com atividade tanto de FSH quanto de LH e que possui meia-vida de aproximadamente 40 horas na vaca, permanecendo circulante por até 10 dias na corrente sanguínea (Murphy & Martinuk, 1991). Por esse motivo, comumente é administrada em uma única dose, já que uma única aplicação induzirá à superestimulação ovariana. No entanto, devido à sua prolongada meia-vida, também pode resultar em contínua estimulação ovariana, formação de cistos ovarianos, perfis endócrinos irregulares e redução na qualidade dos embriões (Jensen et al., 1982). Estes problemas foram em parte superados através da administração intravenosa de anticorpos contra o eCG no início do estro, 12 a 18 horas após o seu início (Dieleman et al., 1993). Entretanto, a comercialização deste anticorpo foi interrompida na década de 1990 e, devido a esses obstáculos, a maioria dos profissionais fez a transição do uso do eCG para o FSH.

A maioria dos protocolos utilizados atualmente para a superestimulação ovariana em fêmeas bovinas baseia-se na utilização de extratos hipofisários contendo FSH (Bó & Mapletoft, 2014; Bó et al., 2018). O FSH é produzido nas células gonadotrópicas da hipófise anterior e

desempenha um importante papel nos ovários estimulando o recrutamento e desenvolvimento folicular (Sartori et al., 2010). No entanto, é importante destacar que os extratos brutos de hipófise também contêm uma quantidade significativa de LH. Além disso, existe uma variação considerável nos teores de FSH e LH de todas as preparações brutas de gonadotrofinas (Murphy et al., 1984), o que pode afetar a resposta do animal.

De fato, foi relatado que extratos hipofisários purificados com baixa presença de LH melhoram a resposta à superovulação em bovinos. Em um estudo conduzido por Chupin et al. (1984), vacas leiteiras foram submetidas à superestimulação utilizando uma dose constante de 450µg de FSH suíno purificado (pFSH), mas com diferentes quantidades de LH administrados. Os resultados mostraram que a redução da quantidade de LH resultou em um aumento na média da taxa de ovulação e do número de embriões recuperados, incluindo aqueles aptos à transferência. Sugere-se que níveis elevados de LH durante o protocolo de superestimulação podem resultar em ativação parcial prematura dos ovócitos nos folículos que apresentam maior grau de diferenciação no momento da administração hormonal (Moor et al., 1984). Willmott et al. (1990) avaliaram os efeitos da administração exógena de LH na resposta superovulatória em bovinos. Os animais foram distribuídos em grupos que receberam diferentes preparações de FSH, variando a quantidade de LH. Vacas do Grupo I receberam um extrato padrão de hipófise suína (100% de LH), vacas do Grupo II receberam uma preparação com aproximadamente 32% de LH, vacas do Grupo III receberam uma preparação com cerca de 16% de LH (equivalente ao Folltropin®-V), e vacas do Grupo IV receberam uma preparação com 98% de LH removido (FSH Puro). Os resultados mostraram que as respostas superovulatórias dividiram-se em duas categorias distintas de vacas: aquelas com alto LH e aquelas com baixo LH. Os grupos com menor teor de LH tiveram mais ovulações e uma tendência a maior taxa de fecundação, sugerindo que a presença de LH nas preparações de FSH afeta a resposta superovulatória, e o nível máximo aceitável de LH parece situar-se entre 15 e 20%.

Uma limitação no uso de FSH hipofisário se deve ao fato de que os extratos apresentam restrições em termos de disponibilidade, pureza e riscos sanitários (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Uma alternativa para contornar esse problema é o desenvolvimento de formulações de FSH recombinante (rFSH). Produtos recombinantes são proteínas criadas por meio da tecnologia de DNA recombinante, utilizando processos biológicos para produzir medicamentos de moléculas grandes que não podem ser sintetizadas quimicamente. As gonadotrofinas recombinantes foram criadas para contornar essas limitações dos produtos anteriores, possibilitando a produção em grande escala com elevada pureza e uniformidade na composição (Lunenfeld et al., 2019). As formulações de FSH recombinante têm sido empregadas na

medicina humana por vários anos e, mais recentemente, têm ganhado notoriedade também na reprodução animal. Gutiérrez-Reinoso et al. (2023) avaliaram os efeitos rFSH e do pFSH na resposta ovariana e produção embrionária de novilhas superovuladas e inseminadas com sêmen sexado ou convencional. Os autores constataram que o protocolo de SOV utilizando rFSH apresentou melhores resultados em comparação ao pFSH no que diz respeito aos parâmetros ovarianos (número de corpos lúteos) e embrionários (total de estruturas, total de embriões, embriões transferíveis e embriões degenerados), independentemente do tipo de sêmen utilizado.

Uma das limitações da SOV está relacionada à curta meia-vida do FSH em bovinos (5 a 10 ou 12 horas), o que torna necessária a realização de duas injeções diárias (Demoustier et al., 1988). Esse procedimento é laborioso, podendo gerar estresse desnecessário nos animais, além de apresentar o risco de inadvertidamente deixar de administrar uma das injeções. Uma alternativa para induzir uma resposta superovulatória adequada com uma única injeção de FSH seria combiná-lo com agentes que promovem a liberação lenta do hormônio ao longo de vários dias. Por exemplo, estudos demonstraram que a mistura de FSH com polivinilpirrolidona (PVP) retardou a sua liberação e manteve a sua concentração na corrente sanguínea em níveis adequados para indução do desenvolvimento de múltiplos folículos (Yamamoto et al., 1994; Takedomi et al., 1995). Outro agente utilizado para retardar a liberação de FSH é o ácido hialurônico, uma glicosaminoglicana amplamente presente no corpo. Foi demonstrado que uma única injeção intramuscular de Folltropin-V diluído em 20 mg/mL de hialuronano resultou em uma resposta superovulatória comparável ao protocolo tradicional de duas vezes ao dia em vacas Angus (Tribulo et al., 2011). Entre outros veículos, a injeção subcutânea de FSH em gel de hidróxido de alumínio (AH-gel) também possibilitou em uma única administração o crescimento de múltiplos folículos, ovulação e a produção de vários embriões (Kimura, 2016).

A eficácia da técnica TE manteve-se relativamente estável ao longo de quatro décadas. Conforme demonstrado pela Associação Americana de Transferência de Embriões (AETA), a produção média de embriões no ano de 2022 foi de 6,7 embriões em vacas de corte e 5,3 embriões em vacas de leite (Looney et al., 2023). Na década de 80, a produção média de embriões em vacas de corte era de 6,2 embriões/vaca (Looney, 1986) e de 6,4 para vacas de leite (Hasler et al., 1983). Segundo a literatura, aproximadamente 25% das fêmeas submetidas ao protocolo de superovulação não produzem nenhum embrião transferível, 25% respondem muito bem (gerando mais de 10 embriões viáveis) e os 50% restantes apresentam uma resposta intermediária (Looney, 1986). A alta variabilidade individual e a baixa repetibilidade na resposta superovulatória são características da técnica que parecem permanecer constantes até o momento, resultando na redução da frequência de coletas por ano e no aumento dos custos de

produção (Bó & Mapletoft, 2014). Esta variabilidade está relacionada a diversos fatores na superestimulação, como a fonte da gonadotrofina, lote, dose total administrada, duração e horário dos tratamentos, além do uso de hormônios adicionais. Além disso, fatores intrínsecos ao animal e ao ambiente, como estado nutricional, histórico reprodutivo, idade, estação, raça, efeitos de superestimulações repetidas e tamanho da reserva ovariana, também são relevantes (Mikkola et al., 2019).

A falta de previsibilidade associado ao número limitado de coletas, que impactam negativamente a eficácia e o retorno financeiro da técnica, tornaram a produção in vivo de embriões menos atrativa do que a PIVE. O ano de 2017 representou um momento histórico na produção de embriões bovinos, marcando a primeira vez, registrada pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), em que o número de embriões provenientes de PIVE superou àqueles gerados in vivo (992.289 vs. 406.287, respectivamente) (Viana, 2018). Este cenário se mantém até o momento, com a tecnologia in vitro predominante na produção de embriões. Atualmente, os embriões derivados de SOV representam apenas 20,3% do total de embriões registrados e 21,2% dos embriões transferidos em todo o mundo (Viana, 2022).

Apesar da diminuição no uso da produção in vivo de embriões, é conhecido que por se beneficiarem do ambiente do trato reprodutivo feminino, os embriões gerados in vivo apresentam qualidade superior aos seus homólogos PIV (Martins et al., 2011). Esse diferencial se reflete nas taxas de prenhez, que variam de 40% a 60% para embriões gerados in vivo (Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2010), enquanto se situam na faixa de 40% para embriões PIV (Wrenzycki, 2016).

2.1.2 PIVE

A PIVE é uma técnica que viabiliza a interação entre os gametas feminino e masculino fora do trato reprodutivo da fêmea para a formação de um novo indivíduo. Esta técnica envolve a coleta de ovócitos imaturos, maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e cultivo in vitro (CIV) de embriões até o estágio de blastocisto, quando podem ser transferidos para fêmeas receptoras ou criopreservados para uso futuro (Moore & Hasler, 2017). É uma importante biotécnica para exploração do potencial genético de fêmeas bovinas, uma vez que se estima que com seu uso seja possível produzir até um bezerro por semana (Watanabe et al., 1998).

A PIVE viabiliza a utilização de bezerras pré-púberes, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o processo de melhoramento genético e de ganho genético em carne ou

em leite. Além disso, podem ser produzidos embriões a partir de fêmeas prenhes até o terceiro mês de gestação, sem que haja qualquer prejuízo ao feto, e entre duas a três semanas após o parto (Hasler et al., 1995), assim como a partir de animais senis, mortos ou com infertilidade adquirida (Bungartz et al., 1995). Portanto, com o uso desta tecnologia pode-se obter descendentes praticamente durante toda a vida do animal, maximizando seu potencial reprodutivo.

Apesar dos experimentos com a fecundação *in vitro* em roedores datando desde a década de 1950 (Austin, 1951; Chang, 1959) foi somente em 1978, com o nascimento de Louise Brown na Inglaterra, que a técnica adquiriu notoriedade mundialmente (Steptoe & Edwards, 1978). Esse foi o primeiro caso em que um ovócito humano foi recuperado, fecundado *in vitro*, cultivado em meio de cultura até o estágio de oito células e implantado no lúmen uterino, onde se desenvolveu a termo. Esse marco desencadeou uma intensificação significativa de esforços científicos, visando adaptar e aprimorar a técnica para se tornar eficaz em outros mamíferos, incluindo o bovino.

O primeiro relato de um bezerro sadio produzido por fecundação *in vitro* foi publicado por Brackett et al. (1982), após o nascimento do bezerro Virgil, em 9 de junho de 1981. Neste estudo, os ovócitos foram recuperados dos folículos ovarianos próximo à ovulação após tratamento de doadoras com PMSG e prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), sendo posteriormente fecundados e cultivados *in vitro*. Na época, a recuperação dos ovócitos e a transferência de embriões eram realizadas por meio de laparotomia.

Posteriormente, a OPU foi desenvolvida em humanos (Gleicher et al., 1983) e depois adotada em bovinos (Callesen et al., 1987). O desenvolvimento da OPU pode ser considerado um passo essencial para a aplicação da PIVE a nível comercial, uma vez que tornou o procedimento de obtenção dos ovócitos menos invasivo, mais rápido e conveniente. Esse avanço possibilitou a otimização da técnica, tanto em relação à quantidade de animais submetidos à punção quanto à frequência de sessões realizadas no mesmo animal.

No Brasil, a PIVE em bovinos teve início nos anos de 1990, quando diversos grupos de pesquisa passaram a dedicar seus esforços a essa tecnologia. O primeiro relato de bezerro oriundo da PIVE no Brasil foi em 1993 (Rubin, 2005). Entretanto, a atividade comercial bem-sucedida começou por volta de 1998-1999, com a abertura dos primeiros laboratórios comerciais, e o aumento gradual no uso da PIVE resultou em um crescimento significativo na indústria de embriões a partir desse período (Viana et al., 2012).

Nos anos 2000, a técnica vivenciou uma marcante consolidação e ampliação no âmbito comercial. De maneira impressionante, em um intervalo de apenas cinco anos, o Brasil emergiu

como referência internacional na adoção da PIVE em bovinos, representando cerca de 41% do total global de embriões PIV em 2005 (Viana et al., 2017). Atualmente, o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor mundial de embriões PIV, registrando um total de 429.848 embriões em comparação aos 642.211 dos Estados Unidos no ano de 2021 (Viana, 2022).

Apesar de a quantidade de embriões produzidos *in vivo* e transferidos mundialmente ter mantido uma relativa estabilidade nos últimos anos, a transferência de embriões PIV cresce a cada ano. Relatórios recentes apontam que, do total de embriões transferíveis registrados no ano de 2021 (1.907.392), 386.374 foram gerados *in vivo* (20,26%), enquanto 1.521.018 foram PIV (79,74%) (Viana, 2022). Observou-se em 2021 um notável aumento no número de embriões PIV registrados face ao ano anterior (1.521.018 vs 1.156.422 em 2020; +31,5%), o que levou ao aumento de 25,6% no total mundial, o maior desde 2003. Esse expressivo crescimento foi impulsionado principalmente pela América do Norte e América do Sul, sendo estes responsáveis por 95,7% dos embriões PIV no mundo todo (Viana, 2022).

Por mais que a PIVE tenha sido o método predominante para a produção de embriões bovinos, existem preocupações e limitações no seu uso. Os embriões PIV possuem um baixo índice de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Dos ovócitos inicialmente submetidos à maturação *in vitro*, aproximadamente 30 a 40% alcançam o estágio de blastocisto (Lacerda et al., 2020; Leme et al., 2020; Mendonça et al., 2022). Além disso, conforme revisado por Ealy et al. (2019), as taxas de prenhez em vários estudos foram menores em gestações derivadas de embriões PIV do que em gestações derivadas de embriões produzidos *in vivo*, com intervalo de redução de 10% a 40%. A média dos resultados indicou que as taxas de prenhez foram aproximadamente 25% inferiores para embriões PIV em comparação aos seus homólogos *in vivo*. Ademais, embriões PIV são associados a maiores perdas após a transferência que, em maior parte, ocorrem no início da gestação (Ealy et al., 2019). No 17º dia de gestação, foi observado um maior número de embriões degenerados recuperados de receptoras de embriões PIV, em comparação com aqueles gerados *in vivo* (Barnwell et al., 2015). Após a transferência de 2449 embriões PIV (em grupos de 3 a 30), foi relatado 24% de mortalidade embrionária inerente à qualidade do embrião durante a segunda semana de gestação (Berg et al., 2010).

Embriões PIV também apresentam menor resistência às técnicas de criopreservação (Fair et al., 2001; Dode et al., 2013; Sudano et al., 2014), o que se reflete em taxas de prenhez inferiores após a transferência de embriões congelados, quando comparadas aos embriões frescos. No estudo conduzido por Sanches et al. (2016), que comparou as taxas de prenhez em vacas Girolando utilizando embriões bovinos frescos, vitrificados ou congelados para transferência direta (DT), observou-se que as taxas de concepção utilizando embriões

vitricados ($35,89 \pm 3,87\%$) ou congelados para DT ($40,19 \pm 4,65\%$) foram significativamente inferiores em comparação com os embriões transferidos frescos ($51,35 \pm 1,87\%$).

A PIVE está relacionada a uma maior incidência de complicações após a transferência. Siqueira et al. (2020) revisaram as principais as consequências pós-transferência de embriões bovinos PIV ao longo dos últimos 25 anos. Entre as principais consequências, os autores relatam: perturbações no desenvolvimento fetal, menor número de placentomas, aumento do tamanho e do peso corporal fetal, maior duração gestacional, maior porcentagem de malformações congênitas, dificuldade de parto e maior número de partos distócicos, peso anormal ao nascer, maior incidência de retenção de placenta, maior mortalidade perinatal e menor produção de leite, gordura e proteína por vacas derivadas de PIVE usando sêmen sexado.

Embriões PIV apresentam algumas características morfológicas e moleculares diferentes dos embriões produzidos *in vivo*. Dentre elas, pode-se citar o excessivo acúmulo lipídico no citoplasma atribuído ao soro fetal bovino (SFB) adicionado aos meios de cultura, através do aumento da captação de lipídios do meio e/ou por perturbação do metabolismo das mitocôndrias (Pereira & Marques, 2008). Esse acúmulo leva a alterações na fluidez e função da membrana plasmática das células embrionárias, que acarretam problemas relacionados à permeabilidade celular aos crioprotetores (Sudano et al., 2012).

Pode-se mencionar também que embriões PIV exibem uma maior quantidade de vacúolos, expressão reduzida de comunicações intercelulares, compactação menos acentuada, um disco embrionário geralmente de menor tamanho e com uma contagem celular inferior, menor densidade de volume das mitocôndrias, além de menor quantidade total de células e uma zona pelúcida mais frágil quando comparados aos embriões gerados *in vivo* (Crosier et al., 2001; Fair et al., 2001). Ainda, a nível molecular, o ambiente de cultivo embrionário parece estar relacionado com a alteração de padrão de expressão gênica no embrião (Mundim et al., 2009; Machado et al., 2013; Noguchi et al., 2020; Leme et al., 2021) e de metilação do DNA (Mendonça et al., 2019), que por sua vez pode ter implicações na qualidade e viabilidade do blastocisto (Lonergan et al., 2006).

Uma vez que o ambiente de cultivo pode exercer uma influência no fenótipo e no transcriptoma do embrião (Enright et al., 2000; Driver et al., 2012), as alterações nos protocolos de cultivo se tornam, portanto, uma estratégia lógica para aprimorar a viabilidade embrionária e aumentar a sobrevivência pós-criopreservação e as taxas de sucesso na prenhez. Nesse sentido, diversas pesquisas já empreenderam esforços para aprimorar os sistemas de maturação e cultivo *in vitro*, abrangendo por exemplo adições ou substituições de suplementos nos meios utilizados, como Forscolina (Paschoal et al., 2014), insulina-transferrina-selênio (ITS) e ácido

L-ascórbico (AA) (Guimarães et al., 2016; Mendonça et al., 2022), melatonina (Marques et al., 2018; Marques et al., 2021), l-carnitina (Zolini et al., 2019), extratos antioxidantes (Fidelis et al., 2020), FLI (FGF2, LIF e IGF1) (Stoecklein et al., 2022), entre outros.

2.1.3 TIFOI

Para contornar as limitações da produção in vivo de embriões por meio da SOV e os impactos negativos do cultivo in vitro em embriões bovinos, foi recentemente estabelecido um novo método para produzir embriões, a TIFOI. Dentre as vantagens desta técnica, destaca-se o fato de que ela dispensa a onerosa estrutura laboratorial e equipamentos da PIVE, pois utiliza o trato genital feminino para maturação ovocitária, fecundação e para o desenvolvimento embrionário inicial até a coleta dos embriões, já no estágio de blastocisto (Sprícigo et al., 2016).

Nessa técnica os ovócitos são obtidos por meio de OPU, assim como na PIVE, mas em vez de serem maturados em laboratório, são injetados em um folículo dominante que esteja próximo da ovulação em uma vaca previamente sincronizada (ovuladora), onde ocorrerá a maturação e a consequente ovulação. Esta fêmea é inseminada artificialmente e o desenvolvimento embrionário inicial ocorre em seu trato reprodutivo, se beneficiando dos seus eventos fisiológicos. Oito dias após a injeção dos ovócitos, é realizada a coleta de embriões por meio de lavagem uterina. Por fim, os embriões coletados podem ser transferidos para fêmeas receptoras que foram previamente protocoladas, as quais continuarão a gestação a termo, ou então podem ser criopreservados para utilização posterior (Sprícigo & Dode, 2017).

Em 1985, Fleming et al. realizaram o primeiro experimento de transferência de ovócitos imaturos para o interior de um folículo pré-ovulatório, utilizando fêmeas bovinas e babuínas. Neste experimento, as fêmeas bovinas foram superestimuladas com doses decrescentes de FSH durante quatro dias e submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) para aspiração dos folículos ovarianos. Os ovários de babuínos foram obtidos de fêmeas não estimuladas, após eutanásia. Posteriormente, os ovócitos recuperados foram injetados no folículo dominante das fêmeas ovuladoras. Em bovinos, foi realizada a injeção de 10 a 27 ovócitos nas vacas ovuladoras, após a exposição dos ovários por incisão na região do flanco. Para os babuínos, a injeção de 10 a 27 ovócitos foi realizada por meio de laparoscopia. Todas as ovuladoras foram acasaladas (babuíno) ou inseminadas artificialmente (vaca). A lavagem uterina foi realizada sete (vaca) ou 5 dias (babuíno) depois. Os resultados indicaram ocorrência de ovulação normal e evidências de fecundação e clivagem com a recuperação de embriões normais no estágio

apropriado de desenvolvimento. No entanto, das 14 fêmeas que ovularam, a lavagem uterina resultou em apenas 1 embrião de duas fêmeas (1 babuíno, 1 vaca) e 2 de uma vaca.

Posteriormente, Hinrichs e Digiorgio (1991) foram os primeiros a desenvolver a técnica em equinos. Neste estudo, ovócitos equinos imaturos, obtidos de um abatedouro, foram injetados no folículo pré-ovulatório de uma égua por meio da inserção de um trocater e uma cânula através da parede abdominal na região do flanco, ipsilateral ao ovário apreendido. Para a transferência, era introduzida uma agulha através da cânula para perfurar a parede externa do folículo. As éguas foram inseminadas no dia seguinte à transferência. A lavagem uterina para recuperação de embriões foi realizada em 15 éguas, de 7 a 11 dias após a ovulação. Em 7 das 15 lavagens, embriões foram recuperados, e em 4 éguas, embriões extras foram recuperados, descontando-se um embrião que poderia ter sido gerado a partir do ovócito da ovuladora (2, 3, 4 e 7 embriões).

Após alguns anos, houve o aperfeiçoamento da técnica, que passou a ser realizada com auxílio de guia de aspiração transvaginal em humanos (Werner-Von Der Burg et al., 1993) equinos (Goudet et al., 1997) e bovinos (Bergfelt et al., 1998). Bergfelt et al. (1998) documentaram o primeiro relato de embriões bovinos produzidos através de injeção de ovócitos utilizando ultrassonografia transvaginal. Neste estudo, 7 ovuladoras foram submetidas à TIFOI com 5 ou 6 CCOs em 200 µl de meio veículo. Após a TIFOI, foi realizada a indução da ovulação e inseminação artificial. Dois a três dias após a ovulação, as vacas foram enviadas para o abatedouro, onde as tubas uterinas foram lavadas. Um total de 43 ovócitos/embriões representou o número máximo que poderia ter sido coletado, contabilizando ovócitos endógenos e exógenos. Foram coletadas 16 (37%) estruturas, das quais 8 eram ovócitos não fecundados e 8 estavam no estágio de 3 a 8 células. Estes 8 embriões foram coletados de 3 das 7 ovuladoras injetadas.

Em 2015, três décadas após o primeiro experimento com TIFOI, pesquisadores alemães (Kassens et al., 2015) realizaram um estudo que visava investigar se ovócitos maturados *in vitro* poderiam seguir o processo natural de ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário dentro da tuba uterina. Em segundo lugar, o estudo teve como objetivo analisar as características de desenvolvimento dos embriões obtidos por meio de transferência intrafolicular, em comparação com embriões PIV ou gerados *in vivo* por SOV. Foram transferidos 1646 ovócitos obtidos de ovários de abatedouro e maturados *in vitro* para 28 novilhas da raça Simental, resultando na recuperação de um total de 583 estruturas (35,2%) durante a lavagem uterina. No entanto, a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi inferior com embriões derivados da transferência intrafolicular, em comparação com embriões controle PIV (8,0% vs.

36,5%). Embriões resultantes de transferência intrafolicular apresentaram menor taxa de clivagem, mas maior criotolerância e menor conteúdo lipídico em comparação com embriões PIV. Além disso, a transferência desses embriões resultou em taxas de gestação comparáveis às obtidas com embriões produzidos *in vivo* ou PIV em meio SOF com BSA (Albumina sérica bovina). Por fim, sete gestações chegaram a termo, e as análises confirmaram cinco bezerros derivados de transferência intrafolicular. Este foi o primeiro relato de bezerros nascidos após a transferência intrafolicular de ovócitos em bovinos.

Em 2016, pela primeira vez a técnica foi realizada utilizando um sistema completamente *in vivo*. No estudo conduzido por Sprícigo et al. (2016), foram utilizadas doadoras da raça Gir para obtenção de ovócitos imaturos por meio de OPU. Esses ovócitos foram então injetados em grupos de 10 a 22 em ovuladoras da raça Nelore submetidas a um protocolo de sincronização de estro. Oito dias depois, foi realizada lavagem uterina para coleta de embriões e 21,3% do total de estruturas transferidas foram recuperadas, sendo deste total, 5,5% embriões. Posteriormente, os embriões foram transferidos para vacas receptoras. Como resultado, quatro bezerros saudáveis nasceram, sendo três deles provenientes da TIFOI e um originado a partir do ovócito da ovuladora.

Em 2017, Hoelker et al. relataram o nascimento de bezerros produzidos a partir de transferência de ovócitos imaturos provenientes de ovários de abatedouro. Um total de 791 ovócitos imaturos foram transferidos, em grupos de aproximadamente 50, para folículos pré-ovulatórios de 16 novilhas receptoras. Oito dias após a TIFOI, foi possível recuperar 306 estruturas (38,5%), sendo que deste total, 40,1% evoluíram para o estágio de mórula e/ou blastocisto. Os autores relatam que os embriões TIFOI alcançaram taxas de desenvolvimento significativamente superiores para o estágio de mórula e/ou blastocisto até o dia 7, em comparação com os embriões cultivados *in vitro* (controle), apesar de serem derivados da mesma carga de ovários de abatedouro (40,1 vs. 29,3%). Isso demonstra que há um efeito benéfico do ambiente folicular para a qualidade intrínseca dos ovócitos e, subsequentemente, para as taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

Em um estudo conduzido por Martinez et al. (2019), foram avaliadas as taxas de produção de embriões após TIFOI autóloga e alogênica em éguas inseminadas. A TIFOI autóloga seria benéfica para uso clínico em animais de genética superior, pois a égua atuaria como sua própria receptora e, portanto, todos os embriões recuperados seriam originados do animal desejado. Já na TIFOI alogênica permite-se que a TIFOI seja realizada para produzir embriões a partir de doadoras com afecções em seu trato genital que afetem sua eficiência reprodutiva. A proporção de éguas que produziram embriões derivados de TIFOI foi menor

após TIFOI autóloga, em comparação com TIFOI alogênica (0/13 vs. 4/11; $P \leq 0.05$). No geral, o estudo confirmou que CCOs imaturos podem sofrer maturação e manter competência de desenvolvimento dentro do folículo de éguas. No entanto, os autores concluíram que o procedimento ainda não demonstrou repetibilidade suficiente para utilização em equinos.

Andrlikova et al. (2020) realizaram um estudo que objetivou desenvolver e avaliar um novo equipamento para a TIFOI em bovinos leiteiros. O sistema é composto por um aplicador, um aspirador e um injetor. Após a aspiração dos CCOs, o sistema é inserido no suporte do transdutor de ultrassom, e o conteúdo do aplicador pode ser injetado no folículo pré-ovulatório via ultrassonografia transvaginal por um único operador. Isso representa uma melhoria em relação ao método utilizado até então, no qual eram necessárias duas pessoas para realizar a técnica: uma posicionava o ovário por palpação retal, enquanto outra pressionava o êmbolo da seringa conectada ao sistema para a injeção dos CCOs. O novo sistema otimizou a realização da TIFOI, possibilitando que um único operador executasse a técnica, e resultou em taxas de recuperação após lavagem uterina de 22,5% de estruturas e 10,1% de embriões. No entanto, o método ainda necessita de mais investigações para sua validação completa.

Falchi et al. (2022) estudaram as melhores condições para a injeção em espécies ovinas (diâmetro interno da agulha, número de CCOs utilizados para injeção e volume de meio veículo). A injeção de folículos > 5 mm com uma agulha 28 G carregada com 30 CCOs em um volume de 5 μ l resultou em maiores taxas de recuperação e melhor preservação da integridade dos CCOs. Em uma segunda etapa, a TIFOI foi realizada em cinco ovelhas após exposição dos ovários por meio de laparotomia, utilizando CCOs provenientes de ovários de um abatedouro. Em uma das ovelhas, nenhum embrião foi recuperado após a lavagem uterina. Nos quatro animais restantes, 85 ovócitos foram injetados e 6 embriões clivados, 12 mórulas e 1 blastocisto foram coletados, indicando que a TIFOI resultou em ovulação, captura fimbrial, transporte tubário de ovócitos heterólogos e produção in vivo de embriões em ovinos.

Apesar de a TIFOI ser uma técnica muito promissora e que pode unir as vantagens dos sistemas atuais de produção de embriões, a taxa de recuperação de embriões a partir do total de ovócitos injetados ainda é muito baixa e variável entre ovuladoras individuais. As taxas mais elevadas de formação de blastocistos foram registradas por Hoelker et al. (2017), atingindo 17,3%. Portanto, é importante a avaliação abrangente de todas as fases relacionadas à produção de embriões pela TIFOI, com o objetivo de identificar eventuais problemas que possam impactar negativamente a eficiência da técnica.

2.1.4 Fatores que podem afetar a eficiência da TIFOI

2.1.4.1 Qualidade dos Ovócitos

Embora as condições de cultivo embrionário possam impactar o potencial de desenvolvimento do embrião, sabe-se que a qualidade intrínseca do ovócito desempenha um papel crucial na determinação da porcentagem de ovócitos que podem se desenvolver até o estágio de blastocisto (Lonergan et al., 2003).

Pode-se considerar que a seleção de CCOs com competência de desenvolvimento inicia-se no momento da aspiração folicular para recuperação dos CCOs. Embora, na prática comercial folículos de diversos tamanhos sejam aspirados, já foi demonstrado que existe uma correlação entre o tamanho do folículo do qual o ovócito é obtido e sua competência subsequente para o desenvolvimento *in vitro* (Pavlok et al., 1992). Pesquisas que investigaram o impacto do tamanho do folículo de origem dos ovócitos na capacidade de desenvolvimento *in vitro* mostraram taxas superiores de formação de blastocistos utilizando ovócitos provenientes de folículos com diâmetro superior a 6 mm em comparação com folículos menores (Lonergan et al., 1994; Lequarre et al., 2005; Caixeta et al., 2009). Além disso, foram identificados genes com expressão diferencial em ovócitos e células do cumulus (CC) oriundos de folículos de diferentes tamanhos, cuja expressão pode estar associada à competência ovocitária (Caixeta et al., 2009).

Além do tamanho do folículo, o diâmetro do ovócito também pode ser utilizado como um parâmetro não invasivo de qualidade. No estudo conduzido por Fair et al. (1995), ovócitos recuperados de ovários de abatedouro foram categorizados em quatro grupos conforme o seu diâmetro (<100 μm , 100 a 110 μm , 110 a 120 μm e >120 μm). Observou-se que ovócitos com diâmetro superior a 110 μm apresentaram taxas mais elevadas de retomada da meiose e progressão até a metáfase II. Adicionalmente, ovócitos com diâmetro inferior a 110 μm demonstraram atividade transcripcional, indicando que ainda não haviam completado a fase de crescimento da ovogênese. Conforme revisado por Aguila et al. (2020), ovócitos bovinos atingem competência meiótica a partir de um diâmetro de 115 μm , enquanto a competência total para o desenvolvimento é alcançada por volta de 120 μm , sugerindo que ovócitos menores ainda estão em fase de crescimento. Nos bovinos, o crescimento total do ovócito é atingido quando o folículo no qual ele está inserido tem em torno de 3 mm de diâmetro (Fair et al., 1995).

A seleção de CCOs baseia-se rotineiramente em avaliação morfológica, na qual são analisadas a uniformidade do citoplasma, bem como a compactação e a quantidade de camadas

de CC (Stojkovic et al., 2001). A quantidade de CC é um importante parâmetro a ser avaliado para julgamento da qualidade ovocitária. Estas células são ligadas ao ovócito por meio de junções GAP permeáveis que permitem as trocas iônicas e eletrolíticas entre o meio e o ovócito, sendo também responsáveis pela transferência de aminoácidos, metabólitos de glicose e nucleotídeos para o ovócito em crescimento (Eppig, 1991). Além disso, as CC têm uma ação no controle da retomada da meiose, pois a promoção da quebra da vesícula germinativa por ação de gonadotrofinas é mediada pelas CC (Ali & Sirard, 2005). Assim, a preservação da integridade das CC é essencial nas fases iniciais de desenvolvimento ovocitário, visto que a sua remoção antes da maturação resulta em significativa redução nas taxas de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário (Zhang et al., 1995). A ausência de CC durante a maturação também afetou o metabolismo lipídico no ovócito, resultando em uma maturação citoplasmática inadequada (Auclair et al., 2013). Portanto, sugere-se que além do controle da retomada da meiose, as CC podem atuar no ovócito direcionando o uso de reservas nutritivas por meio da regulação local da síntese de ácidos graxos e da lipólise para fornecer energia durante a maturação (Auclair et al., 2013).

A importância das CC para o ovócito é indiscutível e isso foi muito bem demonstrado no estudo de Atef et al. (2005), no qual as CC foram removidas em diferentes momentos da maturação e observou-se que a remoção destas células até 6h afeta a competência de desenvolvimento do ovócito, resultando em menor taxa de blastocistos após a FIV. Esses resultados sugerem que ao longo da maturação, a comunicação eficaz entre o ovócito e as CC é essencial para promover a maturação citoplasmática e o subsequente desenvolvimento embrionário.

Nagano et al. (2006) estudaram a relação entre morfologia de ovócitos bovinos e o potencial de desenvolvimento *in vitro*. Os pesquisadores observaram que a presença de um ooplasma de tonalidade escura está associada ao acúmulo de lipídios e sugere um potencial de desenvolvimento favorável. Em contraste, a presença de um ooplasma de tonalidade clara indica uma baixa densidade de organelas e um potencial de desenvolvimento reduzido. Além disso, um ooplasma negro é indicativo de envelhecimento e baixo potencial de desenvolvimento. Segundo Stojkovic et al. (2001), ovócitos classificados morfologicamente como bons ou ruins diferem no que diz respeito à reorganização mitocondrial durante a maturação citoplasmática e aos níveis de ATP intracelular, e esses fatores poderiam ser responsáveis por sua diferente capacidade de desenvolvimento após a fecundação *in vitro*, mostrada por maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de mórula ou blastocisto, além de maior número total de células em ovócitos considerados bons.

Embora a avaliação morfológica seja um indicativo da qualidade dos ovócitos, ela, por si só, não é suficiente para distinguir quais os ovócitos competentes. Portanto, vários estudos têm buscado outros parâmetros funcionais e moleculares para uma avaliação mais precisa da viabilidade e capacidade de desenvolvimento dos ovócitos: avaliação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) por meio da coloração com brilliant cresyl blue (BCB) (Pujol et al., 2004), identificação de genes relacionados à competência ovocitária (Caixeta et al., 2009; Kussano et al., 2016; Melo et al., 2017; Pontelo et al., 2021) avaliação do conteúdo lipídico (Jeong et al., 2009; Faria et al., 2021), entre outros. Entretanto, algumas avaliações inviabilizam o uso do ovócito, tornando a avaliação morfológica a escolha prática para uso na rotina.

Na TIFOI, é de grande importância a identificação de ovócitos de qualidade e que apresentem competência de desenvolvimento, visto que somente ovócitos competentes podem passar por maturação completa, fecundação e gerar um embrião viável (Lonergan et al., 2003; Sirard et al., 2006). Portanto, uma seleção criteriosa que viabilize a identificação de CCOs competentes pode impactar de maneira significativa os resultados dessa e de outras técnicas de reprodução assistida.

2.1.4.2 Condições de Injeção

Assim como a qualidade dos ovócitos selecionados, sugere-se que alguns fatores inerentes às condições utilizadas para a injeção podem impactar de forma significativa a eficiência da TIFOI. Entre eles, pode-se citar o diâmetro da agulha utilizada para injeção dos CCOs, o volume e o tipo de meio utilizado como veículo para injeção, o número de CCOs utilizados ou ainda a habilidade do técnico responsável e a qualidade da injeção.

Com relação ao diâmetro da agulha utilizada para a injeção dos CCOs, estudos anteriores fizeram uso de agulhas de calibre 24G (Simões et al., 2021), 25G (Bergfelt et al., 1998; Andriikova et al., 2020), 26G (Kassens et al., 2015; Hoelker et al., 2017), 27G (Sprícigo et al., 2016; Faria et al., 2021) e 28G (Falchi et al., 2022). Este é um importante fator a ser considerado, uma vez que a agulha a ser utilizada deve comportar os CCOs sem causar seu desnudamento e perfurar a parede do folículo sem causar o extravasamento do fluido folicular, que poderia levar à perda dos ovócitos injetados na cavidade abdominal.

Falchi et al. (2022) avaliaram em seu estudo o diâmetro interno ideal da agulha de injeção para a TIFOI em espécies ovinas, utilizando ovários provenientes de abatedouros. Os autores relataram que a agulha de diâmetro 28G apresentou as maiores taxas de recuperação após injeção, mantendo a integridade dos CCOs recuperados. O uso de diâmetros maiores

resultou em extravasamento de fluido dos folículos perfurados e perda de CCOs, enquanto diâmetros menores (por exemplo, 30 G) causaram danos aos CCOs injetados e perda de CC.

O fluido folicular e o meio PBS têm sido utilizados em diversos estudos como veículo para a injeção dos ovócitos, em um volume que varia de 60 a 200 μ l (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andriikova et al., 2020; Faria et al., 2021). Entretanto, é importante ressaltar que, por questões de biossegurança, é recomendável evitar o uso do fluido folicular. Adicionalmente, o meio injetado poderia potencialmente influenciar o ambiente folicular, modificando a composição do líquido folicular. Assim, o ideal seria empregar o menor volume possível que comporte a quantidade de ovócitos a serem injetados, carregando-os adequadamente para o interior do folículo no momento da injeção (Falchi et al., 2022).

Ainda em relação ao volume, é importante destacar a considerável variação nos estudos conduzidos até o momento quanto ao volume do meio de veículo utilizado. No grupo de estudos do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, por exemplo, foram empregados volumes de até 60 μ l nos experimentos realizados (Sprícigo et al., 2016; Faria et al., 2021; Simões et al., 2021). Contudo, a quantidade efetivamente injetada permanece incerta, pois os ovócitos são alocados no sistema de TIFOI com uma quantidade não especificada, enquanto o restante do volume permanece na placa de Petri. Dessa forma, a padronização do volume e a preferência por quantidades menores também contribuiriam para a uniformização dos procedimentos.

No que diz respeito ao número de ovócitos, os estudos conduzidos até o momento utilizaram quantidades variando de 5 a 60 CCOs (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Simões et al., 2021; Ruas et al., 2022). Espera-se com o emprego da TIFOI que o microambiente folicular forneça as condições favoráveis para o desenvolvimento simultâneo de múltiplos ovócitos, se beneficiando dos eventos fisiológicos da fêmea (Sprícigo et al., 2016). Neste sentido, um ambiente bioquímico adequado é fundamental para que isso ocorra. O fluido folicular resulta da transferência de componentes do plasma sanguíneo através da barreira sangue-folículo, além da atividade secretora das células da granulosa, da teca e do CCO (Gosden et al., 1988), e apresenta uma variedade de substâncias, incluindo lipídios, aminoácidos, xenobióticos, nucleotídeos, carboidratos, cofatores e vitaminas, peptídeos, hormônios e substratos energéticos (Alrabiah et al., 2023). Essa composição é especialmente importante no folículo pré-ovulatório, pois esse meio aloja o ovócito e atua como fonte de energia durante a retomada e maturação meiótica (Dumesic et al., 2015). Entretanto, até o presente pouco se sabe sobre como a injeção de CCOs pela TIFOI impacta o microambiente folicular, se há alguma modificação em sua composição, se ocorre competição por nutrientes

entre os CCOs injetados e, inclusive, uma possível resposta imune associada a esse procedimento.

O estudo de Faria et al. (2022) investigou os efeitos da injeção, do número de oócitos injetados e da qualidade da injeção no tamanho do folículo e na recuperação de oócitos após a TIFOI. Quatro grupos experimentais foram estabelecidos: controle (sem injeção), injeção de 60µl de PBS, injeção de 60µl de PBS +25 ovócitos imaturos, e injeção de 60µl de PBS +50 ovócitos imaturos. Os autores observaram que com relação ao grupo controle (sem injeção) houve uma redução significativa no diâmetro e volume do folículo após a injeção, independentemente do número de CCOs injetados. Além disso, a qualidade da injeção, classificada de 1 a 3, mostrou influência significativa na taxa de recuperação de ovócitos (grau 1 - 53,75%^a, 2 - 25,75%^b e 3 - 6,67%^c), independente do número de CCOs utilizados. Estes achados sugerem que além dos fatores supracitados, a própria injeção afeta o folículo, possivelmente contribuindo para a variabilidade na eficiência da técnica.

2.1.4.3 Maturação ovocitária

A maturação ovocitária, que nos bovinos têm duração de 18 a 24 horas, envolve transformações a níveis nuclear, citoplasmático e molecular (Sirard, 2001). A finalidade da maturação ovocitária é gerar um ovócito secundário haploide, o qual contém todas as estruturas biológicas celulares essenciais para viabilizar uma fecundação bem-sucedida e para o início do desenvolvimento embrionário (Hyttel et al., 1997). Os ovócitos das fêmeas bovinas iniciam a maturação nuclear ainda na vida fetal, percorrendo os estágios leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase meiótica I, até ficarem retidos em diplóteno da prófase I, estágio esse chamado de Vesícula Germinativa (VG) (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

In vivo, a meiose é retomada após um estímulo hormonal que tem início com o pico pré-ovulatório de LH, pouco antes da ovulação, enquanto in vitro a simples retirada do ovócito do contato com as células foliculares estimula a retomada da meiose, devido à remoção dos fatores inibidores presentes no ambiente folicular (Sirard, 2001). A maturação nuclear compreende a quebra da vesícula germinativa (VGBD), marcando o final da prófase I, a condensação da cromatina e a progressão pelos estágios de metáfase I, anáfase I e telófase I, seguida pelo início da segunda divisão meiótica, onde o ovócito permanece retido em metáfase II até a fecundação (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

A maturação citoplásmica desempenha um papel crucial na obtenção das condições necessárias para bloqueio da polispermia durante a fecundação, descondensação do

espermatozoide após a penetração no ooplasma e formação dos pró-núcleos feminino e masculino após a fecundação. Este processo engloba a redistribuição de organelas celulares, mediada pelas ações de microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto, a migração de mitocôndrias para uma posição perinuclear e o acúmulo de grânulos corticais periféricamente, próximos à membrana plasmática (Ferreira et al., 2009). Além disso, há um aumento no conteúdo lipídico, uma redução no complexo de Golgi e síntese proteica (Fair, 2003).

A migração das mitocôndrias para regiões de elevado consumo energético é essencial, visto que essas organelas desempenham um papel crucial ao fornecer a energia necessária durante o processo de maturação (Stojkovic et al., 2001). Os grânulos corticais (CG) são organelas derivadas do complexo de Golgi que desempenham um papel crucial na proteção contra a polispermia, por meio da indução de rápidas modificações na zona pelúcida após a fecundação (Hosoe & Shioya, 1997). O aumento gradual do conteúdo lipídico do ovócito ao longo da capacitação e maturação final é de grande importância para a fase inicial de desenvolvimento embrionário, representando um reservatório de energia que é utilizado até o estágio de blastocisto (Hyttel et al., 1997).

A maturação molecular, por sua vez, é uma herança dos transcritos acumulados durante a fase de vesícula germinativa, controlando tanto a progressão nuclear quanto a citoplasmática (Sirard, 2001). Os eventos moleculares englobam a síntese, degradação e modificações de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas, fornecendo ao ovócito os depósitos moleculares necessários para impulsionar o seu desenvolvimento desde a maturação e fecundação, até a ativação do genoma embrionário no estágio de 8 a 16 células (Donnison & Pfeffer, 2004).

Ao utilizar ovócitos para a TIFOI, é crucial garantir que não ocorra assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, o que poderia diminuir consideravelmente a sua capacidade de desenvolvimento. A retomada da meiose ocorre espontaneamente após a retirada do folículo. Portanto, o emprego de inibidores pode ser utilizado até o momento da TIFOI (Faria et al., 2021), permitindo que estes eventos ocorram após exposição ao pico pré-ovulatório de LH endógeno, seguindo um padrão semelhante ao que ocorre no ovócito originário da ovuladora.

Adicionalmente, é crucial que os ovócitos permaneçam tempo suficiente no folículo dominante, até o momento da ovulação, para permitir a retomada meiótica e a progressão até a metáfase II. Um estudo prévio que utilizou a TIFOI para a maturação *in vivo* de ovócitos demonstrou que um período de vinte e duas horas de maturação intrafolicular, após a indução da ovulação, foi adequado para os ovócitos completarem a maturação nuclear (Faria et al., 2021). Por outro lado, um período prolongado de maturação intrafolicular pode resultar na

degeneração dos ovócitos injetados. O estudo de Simões et al. (2021) avaliou a influência do tempo de maturação *in vivo* na cinética de maturação nuclear em ovócitos bovinos. Os resultados mostraram que, ao serem maturados por um período de 28 horas, ocorreu uma redução na taxa de ovócitos em metáfase II, acompanhada por maior incidência de ovócitos degenerados e ativados partenogeneticamente.

Com relação ao diâmetro do folículo a ser utilizado para a TIFOI, é importante ressaltar que há uma diferença marcante entre raças *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. O diâmetro máximo do folículo dominante é menor em vacas da raça Nelore (cerca de 10–12 mm), comparado com cerca de 16–20 mm em vacas da raça Holandesa, ainda que ocorra variações nessas medidas em ambas as raças (Sartori & Barros, 2011). Portanto, presume-se que o gado Nelore tem folículos dominantes e folículos responsivos ao LH menores do que as raças *B. Taurus Taurus*. Este é um importante fator a se considerar no momento da seleção de vacas para a TIFOI, visto que assim é possível estimar a maturidade do folículo e a proximidade da ovulação. Segundo Simões et al. (2012), apesar de ovulações em vacas zebuínas ocorrerem em folículos com diâmetro mínimo de 7,65 mm após indução com LH, altas taxas de ovulação são observadas apenas em folículos com diâmetro acima de 9,0 mm. O aumento no diâmetro do folículo correlacionou-se com uma elevação na expressão gênica das isoformas do receptor de LH (LHR) nas células da granulosa.

Assim, a seleção de folículos dominantes para a TIFOI com base em seu diâmetro, visa escolher aqueles que estão mais próximos da ovulação. Isso assegura que os ovócitos sejam estimulados pelo pico pré-ovulatório de LH e completem a meiose sem que ocorra, no entanto, seu envelhecimento. De fato, Kassens et al. (2015) relataram números significativamente maiores de embriões recuperados para TIFOI realizada em folículos de 13 a 14 mm do que em folículos de 9 a 10 mm, em novilhas da raça Simental (*Bos taurus taurus*), o que pode sugerir que os folículos maiores estariam mais próximos da ovulação.

2.1.4.4 Ovulação

Próximo ao estro, o folículo pré-ovulatório produz grandes concentrações de estradiol. Quando o estradiol circulante atinge um determinado limiar, desencadeia-se um aumento na liberação de GnRH pelo hipotálamo. A onda de LH resultante tem amplitude e frequência suficientes para estimular maturação final e a ovulação do folículo dominante, que ocorre cerca de 24 a 32 horas depois (Sartori & Barros, 2011).

O processo que culmina na ruptura folicular e liberação do ovócito maduro compreende vários elementos. Logo após o pico pré-ovulatório de LH, há um aumento do fluxo sanguíneo no ovário, resultando no extravasamento de proteínas plasmáticas pelos capilares e vênulas pós-capilares, causando edema. Simultaneamente, ocorre a liberação local de substâncias como prostaglandinas, histamina, vasopressina e colagenase, e uma região específica da parede do folículo enfraquece devido à degradação do colágeno presente na túnica albugínea. Esse enfraquecimento da parede folicular, combinado ao aumento da pressão do fluido folicular e à contração das células musculares lisas circundantes, culmina na ruptura parcial da parede folicular, desencadeando, assim, a ovulação (Junqueira & Carneiro, 2004).

Após a ovulação, ocorre a liberação do ovócito no espaço periovariano e captação pelas fimbrias da tuba uterina para transporte até ampola, local onde potencialmente ocorrerá a fecundação (Li & Winuthayanon, 2017). Este processo ocorre fisiologicamente a cada ciclo estral. No entanto, na TIFOI há a introdução de vários ovócitos no folículo, o que poderia possivelmente resultar na perda desses ovócitos devido a falhas no momento da ovulação, como retenção dentro do folículo, ou falhas na captação pelas fimbrias da tuba uterina.

Ruas et al. (2022) avaliaram o efeito da quantidade de CCOs injetada durante a TIFOI na taxa de recuperação de estruturas e embriões no oviduto. Para isso, foram utilizados três grupos experimentais: Grupo Controle (TIFOI com injeção de 60 µl de meio TCM199 com 10% de FBS, sem a presença de CCOs), Grupo 5 (TIFOI com injeção de 5 CCO em 60µL de meio) e Grupo 50 (TIFOI com injeção de 50 CCO em 60 µl de meio). Para investigar se os CCOs injetados e não recuperados na tuba uterina ficariam retidos no folículo após a ovulação, o corpo lúteo (CL) foi dissecado e a cavidade interna foi lavada. A análise revelou taxas semelhantes de recuperação de estruturas totais e embriões na tuba uterina para G5 (24%; 9,3%) e G50 (31,6%; 7,0%). Adicionalmente, em 2 (13,3%) e 7 (45,6%) animais do G5 (2,7%) e G50 (2,1%) foram encontrados CCOs após a dissecação do CL. Esses resultados indicam que a capacidade de captação de CCOs pela fimbria do oviduto e/ou a liberação dos CCOs no momento da ovulação podem ser afetadas, independentemente da quantidade de CCOs utilizada.

2.1.4.5 Transporte de gametas e embriões

Um importante ponto no emprego de biotecnologias que envolvem um programa de sincronização do estro e/ou tratamento com gonadotrofinas é a velocidade de transporte dos espermatozoides até o local da fecundação. Este ponto deve ser levado em consideração devido

à curta vida útil do ovócito, que é em torno de 6 a 12 horas (Gordon, 2003) e que se não fecundado dentro de 12 a 24 horas se degenera e é fagocitado (Junqueira & Carneiro, 2004). Portanto, desde que o tempo de trânsito dos espermatozoides até a ampola dura em média 8 horas (Hafez & Hafez, 2000), o momento da IA e da indução da ovulação deve permitir sincronia entre o período de viabilidade do ovócito e a existência de espermatozoides capacitados na ampola.

Após a ovulação, ocorre o transporte ovocitário através da tuba uterina. Este órgão apresenta uma anatomia delicada composta pelo infundíbulo, ampola e istmo, que possuem camadas musculares dispostas tanto longitudinalmente quanto circularmente, além de células epiteliais ciliadas e secretoras (Hunter, 1988). Estes fatores em conjunto são responsáveis por primeiramente guiar o ovócito até a ampola para que ocorra a fecundação pelo espermatozoide e depois guiar o zigoto e futuro embrião até o lúmen uterino (Croxatto, 2002). Adicionalmente, ao longo do transporte de gametas e do lento trânsito embrionário até o útero, as células secretoras proporcionam um ambiente propício para a produção de nutrientes e fatores necessários para estimular seu desenvolvimento, tais como aminoácidos, proteínas, carboidratos simples e complexos, íons e lipídios (Aguilar et al., 2005).

Na TIFOI, ainda há falta de clareza quanto aos possíveis efeitos da ovulação de múltiplos ovócitos no seu transporte pela tuba uterina e posteriormente para o útero. Em bovinos superovulados, por exemplo, taxas de fecundação mais baixas foram observadas em comparação com animais de uma única ovulação (Sartori et al., 2006). Entre outras causas, isso poderia estar relacionado a distúrbios no transporte dos ovócitos (Kafi & McGowan, 1997). Vale ressaltar que o processo de captação dos ovócitos após a ovulação difere entre essas duas técnicas: Na SOV, a captação ocorre de maneira gradual à medida que os folículos se rompem, enquanto na TIFOI, apenas um folículo rompe, mas a quantidade de CCOs liberados é muito maior. Neste caso, ainda não está claro se a captação e o transporte simultâneo de múltiplas estruturas pela tuba uterina seriam fisiologicamente viáveis.

3 REFERÊNCIAS

- AGUILA, L.; TREULEN, F.; THERRIEN, J.; FELMER, R.; VALDIVIA, M.; SMITH, L. C. Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 1–24, 2020.
- AGUILAR, J.; REYLEY, M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 91–105, 2005.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 303–310, 2005.
- ALRABIAH, N. A.; SIMINTIRAS, C. A.; EVANS, A. C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Biochemical alterations in the follicular fluid of bovine peri-ovulatory follicles and their association with final oocyte maturation. **Reproduction and Fertility**, v. 4, n. 1, 2023.
- ANDRLIKOVA, M.; BINA, V.; KOS, V.; LOPATAROVA, M.; MARKOVA, B.; STENCLOVA, L.; CECH, S. Intrafollicular oocyte transfer in cattle - A technical report. **Acta Veterinaria Brno**, v. 89, n. 1, p. 11–17, 2020.
- ATEF, A. ; FRANÇOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRÉ, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 71, n. 3, p. 358-367, 2005.
- AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 6, p. E599–E613, 2013.
- AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. **Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences**, v. 4, n. 4, p. 581–596, 1951.
- BARNWELL, C. V.; FARIN, P. W.; WHISNANT, C. S.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52, p. 75–81, 2015.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F. S.; NASSER, L. F. T.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 67–74, 2010.

BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P. L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 250–260, 2010.

BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 15–25, 1998.

BETTERIDGE, K. J. Techniques and results in cattle: superovulation. *Em*: BETTERIDGE, K. J. **Embryo Transfer in Farm Animals**. Ottawa: Department of Agriculture, Canada, 1977. p. 1–9.

BETTERIDGE, K. J. An historical look at embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 1981.

BETTERIDGE, K. J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3–4, p. 203–244, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53–72, 2002.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 38–48, 2014.

BÓ, G. A.; ROGAN, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. **Theriogenology**, v. 112, n. 1, p. 26–33, 2018.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147–158, 1982.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 667–675, 1995.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M. H.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: An approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655–664, 2009.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 217, 1987.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v. 184, n. 7, p. 466–467, 1959.

CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 229, 1984.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375–1385, 2001.

CROXATTO, H. B. Physiology of gamete and embryo transport through the Fallopian tube*. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, n. 2, p. 160–169, 2002.

DEMOUSTIER, M. M.; BECKERS, J. F.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J. L.; ECTORS, F. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 379–386, 1988.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DE LOOS, F. A. M. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment? **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 25–42, 1993.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813–1821, 2004.

DRIVER, A. M.; PEÑAGARICANO, F.; HUANG, W.; AHMAD, K. R.; HACKBART, K. S.; WILTBANK, M. C.; KHATIB, H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1185, 2012.

DROST, M.; BRAND, A.; AARTS, M. H. A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 6, n. 5, p. 503–508, 1976.

DUMESIC, D. A.; MELDRUM, D. R.; KATZ-JAFFE, M. G.; KRISHER, R. L.; SCHOOLCRAFT, W. B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303–316, 2015.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; MCCOSKI, S. R. Board invited review: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555–2568, 2019.

ELSDEN, R. P.; HASLER, J. F.; SEIDEL, G. E. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v. 6, n. 5, p. 523–532, 1976.

ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 659–673, 2000.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays**, v. 13, n. 11, p. 569–574, 1991.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 437–442, 1995.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 2, p. 186–195, 2001.

FALCHI, L.; PIVATO, I.; LEDDA, M.; MELOSU, V.; SCANU, A.; PAU, S.; LEDDA, S.; ZEDDA, M. T. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT): Potential feasibility in the ovine species. **Theriogenology**, v. 179, p. 7–13, 2022.

FARIA, O. A. C.; KAWAMOTO, T. S.; DIAS, L. R. O.; FIDELIS, A. A. G.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M. C.; GOMES, A. C. M. M.; SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. Maturation system affects lipid accumulation in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 5, p. 372–380, 2021.

FARIA, O. A. C.; KUSSANO, N. R.; DE FARIA, L. C.; DE CASTRO, D. B. P.; MARTINS, L. P.; SPRICIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. FACTORS AFFECTING INTRAFOLICULAR TRANSFER OF IMMATURE OOCYTES (IFIOT) RESULTS: DOES THE INJECTION MATTERS? **Animal Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 0–0, 2022.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

FIDELIS, A. A. G.; DE OLIVEIRA FERNANDES, G.; MELO, F. R.; DE OLIVEIRA LEME, L.; ADONA, P. R.; KAWAMOTO, T. S.; DODE, M. A. N. Ethanolic extract of dried leaves from the cerrado biome increases the cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

FLEMING, A. D.; SALGADO, R.; KUEHL, T. J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 193, 1985.

GLEICHER, N.; FRIBERG, J.; FULLAN, N.; GIGLIA, R. V.; MAYDEN, K.; KESKY, T.; SIEGEL, I. EGG retrieval for in vitro fertilisation by sonographically controlled vaginal culdocentesis. **The Lancet**, v. 322, n. 8348, p. 508–509, 1983.

GORDON, I. In vitro fertilization. *Em*: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford UK: CABI Publishing, 2003. p. 176–219.

GOSDEN, R. G.; HUNTER, R. H. F.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Reproduction**, v. 82, n. 2, p. 813–825, 1988.

GOUDET, G.; BÉZARD, J.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare? **Equine veterinary journal. Supplement**, v. 29, n. 25, p. 54–59, 1997.

GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA, S. A.; DIÓGENES, M. N.; DODE, M. A. N. Effect of insulin-transferrin-selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during in vitro maturation on in vitro bovine embryo development. **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 890–899, 2016.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M. A.; AGUILERA, C. J.; NAVARRETE, F.; CABEZAS, J.; CASTRO, F. O.; CABEZAS, I.; SÁNCHEZ, O.; GARCÍA-HERREROS, M.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L. Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. **Animals (Basel)**, v. 12, n. 2, p. 153, 2022.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M. A.; ARRESEIGOR, C. J.; DRIEDGER, B.; CABEZAS, I.; HUGUES, F.; PARRA, N. C.; SÁNCHEZ, O.; TOLEDO, J. R.; GARCIA-HERREROS, M. Effects of recombinant FSH (bscrFSH) and pituitary FSH (FSH-p) on embryo production in superovulated dairy heifers inseminated with unsorted and sex-sorted semen. **Animal Reproduction Science**, v. 252, p. 107226, 2023.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Transport and Survival of Gametes. *Em: **Reproduction in Farm Animals***. Hoboken: Wiley, 2000. p. 82–95.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. *Em: **Reprodução animal***. São Paulo: Manole, 2004. p. 33–53.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152–169, 2014.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 151–152, 1995.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; SCHERMERHORN, E. C.; FOOTE, R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v. 19, n. 1, p. 83–99, 1983.

HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 48, n. 292–295, 1891.

HINRICHS, K.; DIGIORGIO, L. M. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 44, n. 1, p. 369–374, 1991.

HOELKER, M.; KASSENS, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD-HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 97, p. 41–49, 2017.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, n. 4, p. 371–376, 1997.

HUNTER, R. H. F. The fallopian tubes: their role in fertility and infertility. *Em: **The Fallopian Tubes***. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1988. p. 191.

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

JENSEN, A. M.; GREVE, T.; MADEJ, A.; EDQVIST, L.-E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 α treated cow. **Theriogenology**, v. 18, n. 1, p. 33–44, 1982.

JEONG, W. J.; CHO, S. J.; LEE, H. S.; DEB, G. K.; LEE, Y. S.; KWON, T. H.; KONG, I. K. Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 584–589, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. *Em: Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 432–451.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2–4, p. 137–157, 1997.

KASSENS, A.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. **Biology of reproduction**, v. 92, n. 6, p. 150, 2015.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847–856, 2000.

KIMURA, K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: A novel superovulation method for cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 5, p. 423–429, 2016.

KUSSANO, N. R.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. L. S.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167–1176, 2016.

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

LEME, L. O.; CARVALHO, J. O.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 141, n. 1, p. 219–227, 2020.

LEME, L. O.; MACHADO, G. M.; FIDELIS, A. A. G.; GUIMARÃES, A. L. S.; SPRÍCIGO, J. F. W.; CARVALHO, J. O.; PIVATO, I.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Transcriptome of D14 in vivo x in vitro bovine embryos: is there any difference? **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 57, n. 6, p. 598–609, 2021.

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 841–859, 2005.

LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 1, p. R1–R26, 2017.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 2006.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation,

fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48–53, 1994.

LONERGAN, P.; PEDERSEN, H. G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P. D.; FAIR, T.; EVANS, A.; BOLAND, M. P. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1096–1100, 2004.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259–267, 2003.

LOONEY, C. Superovulation in beef females. *Em: Proceedings of the 5th Annual Convention of the AETA*, 1986, [...]. AETA, 1986. p. 16–32.

LOONEY, C.; GARCIA-GUERRA, A.; LARSEN, S.; DEMETRIO, D. 2023 Annual Report of the AETA Statistical Information Committee (2022 data). **Annual Report of the AETA Statistical Information Committee**, 2023.

LUNENFELD, B.; BILGER, W.; LONGOBARDI, S.; ALAM, V.; D’HOOGHE, T.; SUNKARA, S. K. The development of gonadotropins for clinical use in the treatment of infertility. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 429, 2019.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A. R.; PIVATO, I.; FIDELIS, A.; SPRICIGO, J. F.; PAULINI, F.; LUCCI, C. M.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 11, p. 936–947, 2013.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601–611, 2002.

MARQUES, T. C.; DA SILVA SANTOS, E. C.; DIESEL, T. O.; LEME, L. O.; MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; DE OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD 2 and HSPB 1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 226–236, 2018.

MARQUES, T. C.; SANTOS, E. C. da S.; DIESEL, T. O.; MARTINS, C. F.; CUMPA, H. C. B.; LEME, L. de O.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; OLIVEIRA, E. B. de; GAMBARINI, M. L. Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134–141, 2021.

MARTINEZ DE ANDINO, E. V.; BROM-DE-LUNA, J. G.; CANESIN, H. S.; RADER, K.; RESENDE, H. L.; RIPLEY, A. M.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K. Intrafollicular oocyte transfer in the horse: effect of autologous vs. allogeneic transfer and time of administration of ovulatory stimulus before transfer. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, p. 1237–1250, 2019.

MARTINS, C. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; DODE, M. A. N. Biotecnologia aplicada a pecuária bovina. *Em: FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M.; DOS REIS JUNIOR, F. B.*

Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 655–708.

MCGOWAN, M. R.; BRAITHWAITE, M.; JOCHLE, W.; MAPLECOFT, R. J. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): A dose response trial. **Theriogenology**, v. 24, n. 2, p. 173–184, 1985.

MELO, E. O.; CORDEIRO, D. M.; PELLEGRINO, R.; WEI, Z.; DAYE, Z. J.; NISHIMURA, R. C.; DODE, M. A. N. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal Genetics**, v. 48, n. 1, p. 19–29, 2017.

MENDONÇA, A. D. S.; SILVEIRA, M. M.; RIOS, Á. F. L.; MANGIAVACCHI, P. M.; CAETANO, A. R.; DODE, M. A. N.; FRANCO, M. M. DNA methylation and functional characterization of the XIST gene during in vitro early embryo development in cattle. **Epigenetics**, v. 14, n. 6, p. 568–588, 2019.

MENDONÇA, A. dos S.; GUIMARÃES, A. L. S.; FIDELIS, A. A. G.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. The use of insulin-transferrin-selenium (ITS), and folic acid on individual in vitro embryo culture systems in cattle. **Theriogenology**, v. 184, p. 153–161, 2022.

MIKKOLA, M.; HASLER, J. F.; TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 104–124, 2019.

MOOR, R. M.; KRUIP, T. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 103–116, 1984.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314–10331, 2017.

MUNDIM, T. C. D.; RAMOS, A. F.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; MELO, E. O.; GOMES, L. F. S.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1398–1407, 2009.

MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W. D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 117–125, 1984.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1991.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. **Zygote**, v. 14, n. 1, p. 53–61, 2006.

NOGUCHI, T.; AIZAWA, T.; MUNAKATA, Y.; IWATA, H. Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 1, p. 35–39, 2020.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; DIAS MAZIERO, R. R.; CROCOMO, L. F.; OÑA MAGALHÃES, L. C.; DA SILVA RASCADO, T.; MARTINS, A.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-

produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 146–157, 2014.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular reproduction and development**, v. 31, n. 1, p. 63–67, 1992.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and Tissue Banking**, v. 9, n. 4, p. 267–277, 2008.

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

PONTELO, T. P.; FRANCO, M. M.; KAWAMOTO, T. S.; CAIXETA, F. M. C.; DE OLIVEIRA LEME, L.; KUSSANO, N. R.; ZANGERONIMO, M. G.; DODE, M. A. N. Histone deacetylase inhibitor during in vitro maturation decreases developmental capacity of bovine oocytes. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0247518, 2021.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M. T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735–744, 2004.

ROWE, R. F.; DEL CAMPO, M. R.; CRITSER, J. K.; GINTHER, O. J. Embryo transfer in cattle: nonsurgical transfer. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 7, p. 1024–1028, 1980.

RUAS, F. L.; SPRICIGO, J. F. W.; BASTOS, M. R.; DUARTE, L. M.; VELOZO, T.; DODE, M. A. N.; PUGLIESI, G.; DE OLIVEIRA CARVALHO, J. Embryo recovery rate in oviduct 2.5 days after IFIOT performed with different amounts of CCOs. **Animal Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 0–0, 2022.

RUBIN, M. I. B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **acta scientiae veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 35–54, 2005.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; COLOMBO PEREIRA, M. H.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147–1151, 2016.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, 2011.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção in vivo e in vitro de embriões bovinos. *Em: PIRES, A. V. Bovinocultura de corte*. 1. ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo: FEALQ, 2010. p. 561–584.

SARTORI, R.; GÜMEN, A.; GUENTHER, J. N.; SOUZA, A. H.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1311–1321, 2006.

SIMÕES, L. M. S.; SANTOS, A. P. C.; BOTTINO, M. P.; LIMA, E. A.; FERNANDES, U. R.; ORLANDI, R. E.; RODRIGUES, S. A. D.; CAIXETA, F. M.; ALVES, N. G.; SOUZA, J. C.;

- QUINTÃO, C. C. R.; CAMARGO, L. S. A.; DODE, M. A. N.; SALES, J. N. S. Nuclear maturation kinetics and in vitro fertilization of immature bovine oocytes injected into pre-ovulatory follicles. **Theriogenology**, v. 166, p. 90–96, 2021.
- SIMÕES, R. A. L.; SATRAPA, R. A.; ROSA, F. S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A. C. S.; ERENO, R. L.; TRINCA, L. A.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, J.; BARROS, C. M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 139–147, 2012.
- SIQUEIRA, L. G.; SILVA, M. V. G.; PANETTO, J. C.; VIANA, J. H. Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 82–97, 2019.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SPRÍCIGO, F. J. W.; DODE, M. A. N. Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 41, n. 1, p. 25–32, 2017.
- SPRÍCIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. de A. D.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. L.; CAIXETA, F. M. C.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 2054–2062, 2016.
- STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 2, n. 8085, p. 366, 1978.
- STOECKLEIN, K. S.; GARCIA-GUERRA, A.; DURAN, B. J.; PRATHER, R. S.; ORTEGA, M. S. Actions of FGF2, LIF, and IGF1 on bovine embryo survival and conceptus elongation following slow-rate freezing. **Frontiers in Animal Science**, v. 3, p. 1040064, 2022.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.
- SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129–1141, 2014.
- SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S. Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v. 43, n. 7, p. 1259–1268, 1995.

TRÍBULO, A.; ROGAN, D.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; ALASINO, R. V.; BELTRAMO, D.; BIANCO, I.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1–2, p. 7–13, 2011.

UMBAUGH, R. E. Superovulation and ovum transfer in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 295–305, 1949.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

VIANA, J. H. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 40, n. 4, 2022.

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 Newsl**, v. 36, n. 4, p. 8–25, 2018.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476–481, 2017.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12–18, 2012.

WATANABE, M. R.; LÔBO, R. B.; FRANCESCHINI, P. H.; DAYAN, A.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V; WATANABE, Y. F. Embryo in vitro production per session of follicular aspiration in Nelore cows. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 26, p. 383, 1998.

WERNER-VON DER BURG, W.; COORDES, I.; HATZMANN, W. Pregnancy following intrafollicular gamete transfer. **Human Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 771–774, 1993.

WILLETT, E. L.; BLACK, W. G.; CASIDA, L. E.; STONE, W. H.; BUCKNER, P. J. Successful Transplantation of a Fertilized Bovine Ovum. **Science**, v. 113, n. 2931, p. 247–247, 1951.

WILLMOTT, N.; SAUNDERS, J.; BO, G. A.; PALASZ, A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of FSHLH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 347, 1990.

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: How far are we from optimal conditions? **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 279–282, 2016.

YAMAMOTO, M.; OOE, M.; KAWAGUCHI, M.; SUZUKI, T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 747–755, 1994.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P. J.; YANG, X.; GODKE, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, n. 3, p. 338–344, 1995.

ZOLINI, A. M.; CARRASCAL-TRIANA, E.; RUIZ DE KING, A.; HANSEN, P. J.; ALVES TORRES, C. A.; BLOCK, J. Effect of addition of L-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, 2019.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Este estudo investigou se as condições da injeção afetam a eficiência da TIFOI e a recuperação final de embriões. Na primeira etapa, testou-se quatro tipos de agulhas (27G Gengival (27G G), 27G WTA® (27G W), 27G Raquidiana (27G R) e 30G Gengival (30G G); dois volumes de meio PBS (10 e 20 μ l) e duas quantidades (25 e 50) de complexos cumulus-ovócitos (CCOs), utilizando ovários de abatedouros. Avaliou-se a resistência na penetração do folículo, o refluxo após a injeção, a porcentagem de CCOs retidos no sistema e as taxas de recuperação e de desnudamento dos CCOs após a aspiração do folículo injetado. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando o software SAS (9.4). As agulhas 27G R e 27G W apresentaram menor taxa de desnudamento ($P \leq 0,05$), comparada as demais. Entretanto, quando essas foram comparadas entre si, menor taxa de desnudamento ($P \leq 0,05$) foi observada com a 27G R. Além disso, com esta agulha houve maior taxa de recuperação ($P \leq 0,05$) com 10 μ l (85,82%) do que com 20 μ l (70,05%). Posteriormente, avaliou-se in vivo a agulha 27G R com 25 (tratamento T25) ou 50 CCOs (T50), em 10 μ l de PBS. A qualidade da injeção foi classificada em graus de 1 (melhor) a 3 (pior). Simultaneamente, grupos de 25 a 30 CCOs foram destinados à produção in vitro de embriões. Nove dias após a TIFOI, foi realizada a lavagem uterina das fêmeas ovuladoras. Os embriões produzidos pela TIFOI e in vitro (PIV) foram avaliados quanto ao diâmetro e número de células. O modelo GLM binomial foi ajustado e calculou-se as razões de chance dos tratamentos e graus de qualidade da injeção para a recuperação de estruturas e de embriões. Os dados de diâmetro e número de células embrionárias foram analisados por ANOVA. A quantidade de CCOs injetados não afetou a recuperação de estruturas ou embriões após a TIFOI ($P > 0,05$), mas as chances de recuperação de embriões foram maiores ($P \leq 0,05$) com injeções de grau 1 do que com injeções de grau 2. Os embriões TIFOI e PIV apresentaram diâmetro e número de células semelhantes ($P > 0,05$). Conclui-se que agulha 27G R com 10 μ l é a mais recomendada para a TIFOI, pois apresenta altas taxas de recuperação, com maior preservação dos CCOs. Além disso, as chances de

recuperação de embriões são afetadas pela qualidade da injeção, mas não pela quantidade de CCOs injetados.

Palavras-chave: Injeção; Folículo; Embriões bovinos; Complexo cumulus-ovócito.

ABSTRACT

This study investigated whether injection conditions affect the efficiency of IFIOT and the final embryo recovery. In the first stage, four types of needles (27G Gengival (27G G), 27G WTA® (27G W), 27G Raquidiana (27G R), and 30G Gengival (30G G); two volumes of PBS medium (10 and 20 μ l) and two amounts (25 and 50) of cumulus-oocyte complexes (COCs) were tested using ovaries from slaughterhouses. Resistance during follicle penetration, reflux after injection, the percentage of COCs retained in the system, and the rates of recovery and denudation of COCs after follicle aspiration were evaluated. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SAS software (9.4). Needles 27G R and 27G W showed lower denudation rate ($P \leq 0.05$) compared to others. However, when these needles were compared between each other, lower denudation rate ($P \leq 0.05$) was observed with 27G R. Additionally, with this needle, there was a higher recovery rate ($P \leq 0.05$) with 10 μ l (85.82%) than with 20 μ l (70.05%). Subsequently, needle 27G R was evaluated in vivo with 25 (T25 treatment) or 50 COCs (T50) in 10 μ l of PBS. The injection quality was classified into grades from 1 (best) to 3 (worst). Simultaneously, groups of 25 to 30 COCs were allocated for in vitro embryo production. Nine days after IFIOT, uterine flushing of ovulating females was performed. Embryos produced by IFIOT and in vitro (IVP) were evaluated for diameter and number of cells. The binomial GLM model was adjusted, and odds ratios of treatments and injection quality grades for structure and embryo recovery were calculated. Embryonic diameter and number of cells data were analyzed by ANOVA. The number of injected COCs did not affect structure or embryo recovery after IFIOT ($P > 0.05$), but the odds of embryo recovery were higher ($P \leq 0.05$) with grade 1 injections than with grade 2 injections. IFIOT and IVP embryos showed similar diameter and number of cells ($P > 0.05$). It can be concluded that the 27G R needle with 10 μ l is the most recommended for IFIOT, as it presents high recovery rates with greater preservation of COCs. Furthermore, the odds of embryo recovery are affected by injection quality but not by the quantity of injected COCs.

Keywords: Injection; Follicle; Bovine embryos; cumulus-oocyte complex.

1 INTRODUÇÃO

Apesar da PIVE ser a técnica mais empregada atualmente para produção de embriões bovinos, ainda há algumas limitações no seu uso. A taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto a partir do total de ovócitos submetidos à maturação *in vitro* é baixa, situando-se entre 30% e 40% (Lacerda et al., 2020; Leme et al., 2020; Mendonça et al., 2022). Além disso, as taxas de prenhez após a transferência de embriões PIV são aproximadamente 25% inferiores em comparação com seus homólogos *in vivo* (Ealy et al., 2019). Adicionalmente, embriões PIV estão associados a maiores perdas embrionárias e fetais após a transferência (Berg et al., 2010; Barnwell et al., 2015; Ealy et al., 2019), além de demonstrarem menor resistência às técnicas de criopreservação (Fair et al., 2001; Dode et al., 2013; Sudano et al., 2014).

Estes problemas, possivelmente, podem ser associados à menor qualidade dos embriões PIVE, que diferem dos embriões gerados *in vivo* em termos de ultraestrutura (Crosier et al., 2001; Lonergan et al., 2006), metabolismo (Khurana & Niemann, 2000), expressão gênica (Mundim et al., 2009; Machado et al., 2013; Noguchi et al., 2020; Leme et al., 2021), padrão de metilação de DNA (Mendonça et al., 2019) e incidência de anormalidades cromossômicas (Lonergan et al., 2004). A maior parte dessas alterações se devem ao ambiente de cultivo *in vitro*, que pode exercer uma influência no fenótipo e no transcriptoma do embrião (Enright et al., 2000; Driver et al., 2012).

Visando melhorar a viabilidade embrionária e aumentar as taxas de sucesso na prenhez, diversos estudos têm concentrado esforços para mudar as condições de cultivo. Dentre as alternativas, destaca-se a suplementação dos meios com substâncias que possam melhor atender as demandas do embrião, tais como insulina-transferrina-selênio (ITS) e ácido L-ascórbico (AA) (Guimarães et al., 2016; Mendonça et al., 2022), melatonina (Marques et al., 2018, Marques et al., 2021), CSF2 (Loureiro et al., 2009), extratos antioxidantes (Fidelis et al., 2020), FLI (FGF2, LIF e IGF1) (Stoecklein et al., 2022), entre outros. No entanto, nenhuma melhora significativa tem sido observada nos últimos anos.

Para contornar os impactos negativos do cultivo *in vitro* na eficiência da PIVE foi recentemente estabelecido um novo método para produzir embriões, a TIFOI. Dentre as vantagens desta técnica, destaca-se o fato de que utiliza o trato genital feminino para maturação ovocitária, fecundação e para o desenvolvimento embrionário inicial até o momento da coleta dos embriões, já no estágio de blastocisto (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016). Desta forma, além de possibilitar a produção de embriões totalmente *in vivo* e, conseqüentemente, de maior qualidade, dispensa a estrutura laboratório diminuindo significativamente os custos finais de produção.

Apesar de a TIFOI ser uma técnica muito promissora, os resultados obtidos até o momento não são satisfatórios para seu uso em escala comercial, pois a taxa de embriões viáveis recuperados a partir do total de ovócitos injetados é muito baixa, em torno de 10 a 12% (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Andrlíkova et al., 2020). Portanto, para que a TIFOI possa ser utilizada comercialmente, é essencial que se torne mais eficiente, ou seja, que se aumente o número de embriões produzidos e recuperados. Os fatores responsáveis pelos resultados obtidos até o momento ainda não estão claros, sendo assim, é importante avaliar todas as etapas envolvidas para que se possa identificar as que mais impactam negativamente a recuperação final dos embriões.

Estudo recente em que os ovócitos injetados pela TIFOI foram aspirados um pouco antes da ovulação mostrou que somente 50% dos ovócitos foram recuperados (Simões et al., 2021), sugerindo que a injeção pode ainda ser um problema e que seu protocolo precisa ser revisto. Além disso, foi observado que após a injeção ocorre uma redução do tamanho do folículo (Faria et al., 2022) e que essa redução pode estar envolvida com a recuperação pós TIFOI. No que se refere a injeção, os procedimentos ainda são variáveis, já que o líquido folicular ou o PBS têm sido utilizados como veículo de CCOs em um volume que varia de 60 a 200 μ l (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andrlíkova et al., 2020; Faria et al., 2021) e com número de CCOs entre de 5 e 60 (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Simões et al., 2021; Ruas et al., 2022). Portanto, é necessário estabelecer esses parâmetros básicos para que se possa então realizar estudos para aumentar a eficiência da técnica.

Com relação ao volume do veículo utilizado, além de sua variação entre os estudos conduzidos até o momento, existe variação entre os próprios grupos de pesquisa. Nos estudos realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, por exemplo, foram empregados volumes de até 60 μ l (Sprícigo et al., 2016; Faria et al., 2021). Contudo, a quantidade efetivamente injetada permanece incerta, pois os ovócitos são alocados no sistema de TIFOI com uma quantidade não especificada, enquanto o restante do volume permanece na placa de

Petri. Dessa forma, a padronização do volume mais adequado para a injeção é fundamental para a uniformização dos procedimentos e para dar prosseguimento a outros estudos investigativos. Falchi et al. (2022) realizaram ensaios in vitro para determinar as melhores condições para a injeção em ovinos e observaram que uma agulha 28 G com um volume de 5 μ l carregada com 30 CCOs resultou em maiores taxas de recuperação e melhor preservação da integridade dos CCOs. Entretanto esse tipo de estudo ainda não foi realizado em bovinos.

Portanto, este estudo teve como objetivo testar diferentes parâmetros como o tipo de agulha, o volume de meio e a quantidade de CCOs utilizados, visando estabelecer as condições de injeção mais adequadas para aumentar a eficiência da produção de embriões pela TIFOI.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF (15°43'52.8"S 47°54'10.3"O) e no Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL) da Embrapa Cerrados, Recanto das Emas-DF (15°57'10.7"S 48°08'09.4"O).

Todos os reagentes utilizados neste estudo, salvo indicação em contrário, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as regulamentações brasileiras relativas à ética animal e pesquisa em saúde e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA / Embrapa Recursos Genéticos Animais e Biotecnologia - Protocolo CEUA Nº 005/2022). No experimento 1, foram utilizados ovários obtidos após o abate dos animais em abatedouros locais. No Experimento 2, CCOs foram obtidos de abatedouros locais e foram utilizados 37 animais mestiços de raças leiteiras para a TIFOI (Figura 1). Os animais foram mantidos em regime de pastejo, com sal mineral e água ad libitum. O experimento foi executado durante o mês de junho de 2023.

Os animais foram avaliados por meio de palpação retal e exame ultrassonográfico para determinar se não havia nenhuma patologia ou anormalidade aparente no trato reprodutivo. A presença de um CL ou folículo dominante nos exames preliminares foram utilizados como critério para inclusão das matrizes no experimento, indicando que estas apresentavam ciclicidade.



Figura 1. Ovuladoras utilizadas no Experimento 2 - Animais mestiços de raças leiteiras do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL).

2.2 Delineamento experimental

2.2.1 Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos após a TIFOI *in vitro*

O objetivo deste experimento foi avaliar se as condições da injeção, tais como tipo de agulha, o volume de meio e a quantidade de CCOs injetados, afetam a porcentagem de ovócitos que efetivamente permanecem dentro do folículo e a qualidade desses ovócitos e de suas células do cumulus (CC). Para isso, avaliou-se o efeito de quatro diferentes agulhas (27G Raquidiana, Unisis®, Fukuoka – Japão (27G R); 27G Gengival, DFL®, Rio de Janeiro - Brasil (27G G); 27G WTA, WTA®, Cravinhos - Brasil (27G W); 30G Gengival, DFL®, Rio de Janeiro - Brasil (30G G), dois volumes de meio PBS (10 e 20 μ l) e duas quantidades de CCOs (25 e 50). Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que quando até 60 μ l foi comparado com 20 μ l, a taxa de recuperação *in vivo* foi semelhante entre os dois grupos quando a injeção era de boa qualidade (resultados não publicados). Entretanto, para confirmar se *in vitro* 60 e 20 μ l

também não seriam diferentes quanto a taxa de recuperação e qualidade dos ovócitos, foi realizado um teste preliminar comparando esses dois volumes. Os resultados mostraram que não houve diferença nem na taxa de desnudamento, nem na taxa de recuperação. Portanto, o volume de 60 μl não foi utilizado nos demais experimentos deste estudo.

Inicialmente, as agulhas a serem testadas foram avaliadas quanto ao comprimento, diâmetros interno e externo e o volume de líquido comportado. Para os testes de injeção intrafolicular de ovócitos *in vitro*, ovários foram coletados em abatedouros locais e aqueles com a presença de folículos com diâmetro > 9 mm foram utilizados. Os CCOs foram aspirados de vários ovários e, após a seleção foram injetados em folículos com o diâmetro pré-estabelecido para a TIFOI. No momento da injeção, avaliou-se a resistência na penetração no folículo, o refluxo a partir do orifício causado pela injeção e se os ovócitos ficaram retidos no sistema (% de retenção). Posteriormente, os folículos injetados foram aspirados e as taxas de recuperação e desnudamento dos CCOs injetados foram avaliadas (Figura 2).

Primeiramente, foram realizadas 5 injeções/tratamento comparando as quatro agulhas, utilizando 20 μl de meio PBS e 25 CCOs. Em uma segunda etapa, foram realizadas 7 injeções/tratamento utilizando as agulhas 27G R e 27G W para avaliar o efeito do volume de meio (10 ou 20 μl) e da quantidade de CCOs (25 e 50) sobre os parâmetros supracitados.

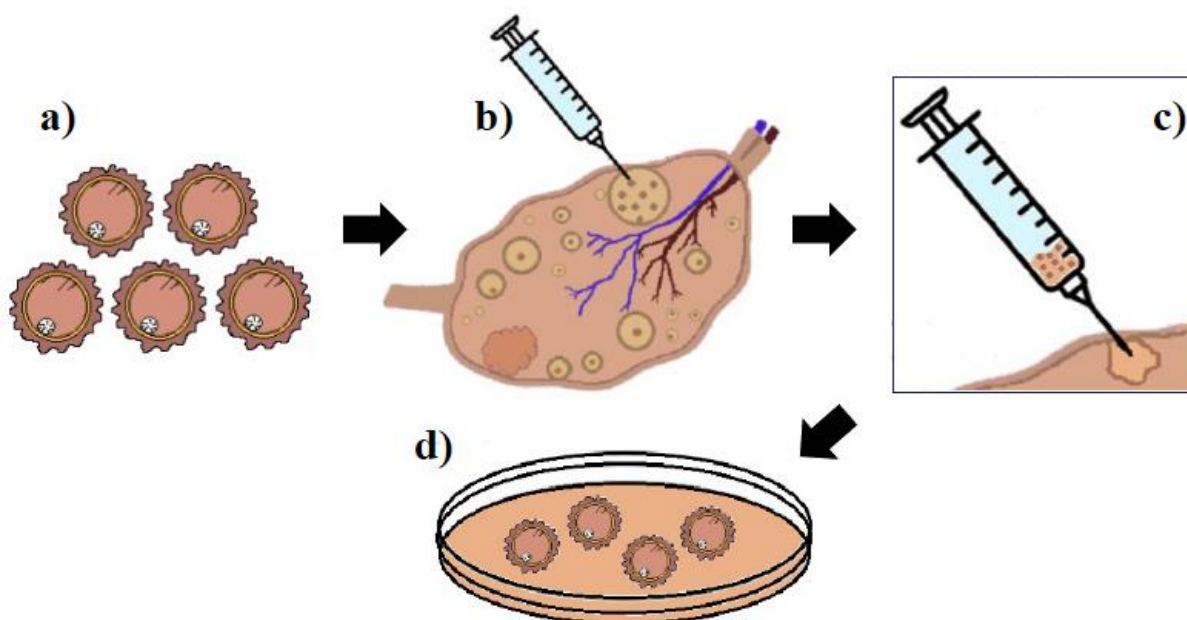


Figura 2. Esquema representativo do experimento 1. a) Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) imaturos utilizados para a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). b) Injeção de um grupo de CCOs em um folículo dominante. c) Aspiração do folículo injetado. d) Rastreamento dos CCOs e avaliação da taxa de recuperação e de desnudamento.

2.2.2 Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI

Após a conclusão dos testes preliminares utilizando ovários obtidos de abatedouro, procedeu-se à avaliação *in vivo*. O segundo experimento foi conduzido com o propósito de determinar se os parâmetros previamente estabelecidos poderiam otimizar a taxa de recuperação de embriões na aplicação da técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos.

Com a intenção de obter um folículo pré-ovulatório no dia da TIFOI, as ovuladoras (n= 37) foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro (Réplica 1: n= 14, Réplica 2: n= 12, Réplica 3: n= 11). Ao todo, vinte e duas vacas foram submetidas à TIFOI, sendo onze com a injeção de 25 CCOs (tratamento T25) e onze com a injeção de 50 CCOs (T50). Para este experimento, utilizou-se a agulha 27G R, com volume de meio PBS de 10 µl. Concomitantemente, grupos de 25 a 30 CCOs foram destinados à maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (MIV controle).

No momento da TIFOI, a qualidade da injeção foi avaliada em uma escala de 1 (melhor) a 3 (pior), seguindo a classificação descrita por Faria et al. (2022). Após a TIFOI, procedeu-se à lavagem do sistema para verificar se ficaram ovócitos retidos. Imediatamente após, as ovuladoras foram inseminadas artificialmente, seguida pela indução da ovulação com GnRH. Nove dias após a TIFOI, realizou-se a coleta de embriões por meio de lavagem uterina. Avaliou-se a taxa de recuperação de estruturas sobre o total de ovócitos injetados, bem como a taxa de embriões. Os embriões TIFOI recuperados foram então transportados ao laboratório para avaliação do diâmetro individual e corados com H33342 para a contagem do número total de células, seguindo o mesmo procedimento aplicado aos embriões do grupo controle.

2.3 Avaliação das agulhas a serem testadas

As agulhas a serem testadas no Experimento 1 foram avaliadas quanto ao comprimento, diâmetro interno, diâmetro externo e o volume de líquido comportado. As informações de comprimento e diâmetro externo foram obtidas dos fabricantes das respectivas agulhas. Para efetuar as medições do diâmetro interno de cada agulha, empregou-se um estereomicroscópio trinocular conectado a uma câmera (SMZ800N, Nikon Corporation, Minato, Tóquio, Japão) utilizando a ferramenta de medição integrada ao dispositivo (Figura 3).

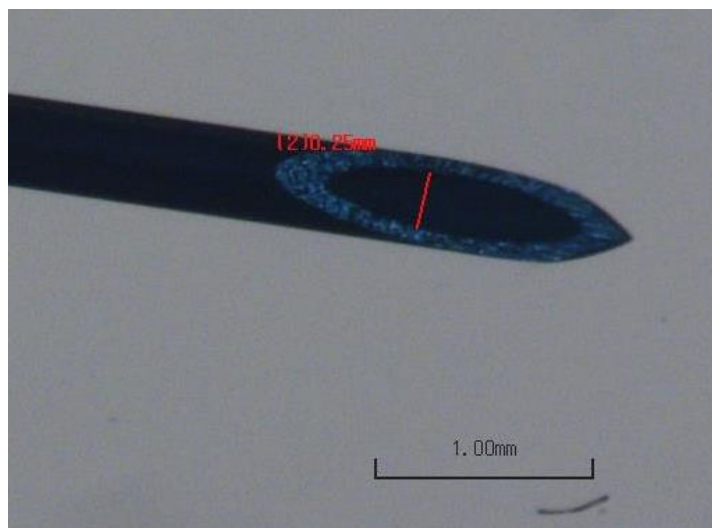


Figura 3. Medição do diâmetro interno da agulha utilizando a ferramenta integrada à câmera.

As medições foram repetidas em cinco vezes para cada agulha, com o propósito de calcular os valores médios. Posteriormente, com base nos dados de diâmetro interno e comprimento, efetuou-se os seguintes cálculos para estimar o volume que cada agulha pode acomodar, expresso em microlitros (μl):

- Área Circunferência = $\pi * r^2$ onde, $\pi = 3.1415$
- $r = \text{Diâmetro Interno} / 2$
- Volume = Área * Comprimento

2.4 Obtenção de Ovócitos Imaturos

Ovários foram coletados em abatedouros locais imediatamente após o abate e transportados ao laboratório a temperatura de 32 a 36°C. Ao chegar no laboratório, os ovários mantidos em solução salina 0,9% (NaCl 0,9%), suplementada com sulfato de estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e penicilina G (100 UI/ml), em banho-maria (32-36° C) durante a aspiração dos folículos.

Os CCOs foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro utilizando uma agulha hipodérmica (18 G) acoplada a uma seringa de 10 mL e transferidos para um tubo cônico de 15 mL. No experimento 1, os ovários com folículos dominantes (9 a 12 mm) foram reservados em frasco contendo solução salina aquecida para posterior utilização. Após a aspiração, aguardou-se pelo menos 10 minutos para sedimentação do *pellet* contendo os ovócitos no fundo do tubo cônico, então 10 mL do fluido folicular sobrenadante foram centrifugados por 5 min a 700 $\times g$

e utilizados para busca e seleção dos CCOs. Somente CCOs com três ou mais camadas de CC e citoplasma regular ou apresentando granulações finas foram selecionados para os experimentos.

2.5 TIFOI em ovários de abatedouro

Para a injeção foi utilizado um sistema fechado, contendo em uma das extremidades uma seringa de insulina e a outra extremidade foi equipada com cada agulha a ser testada (Figura 4).

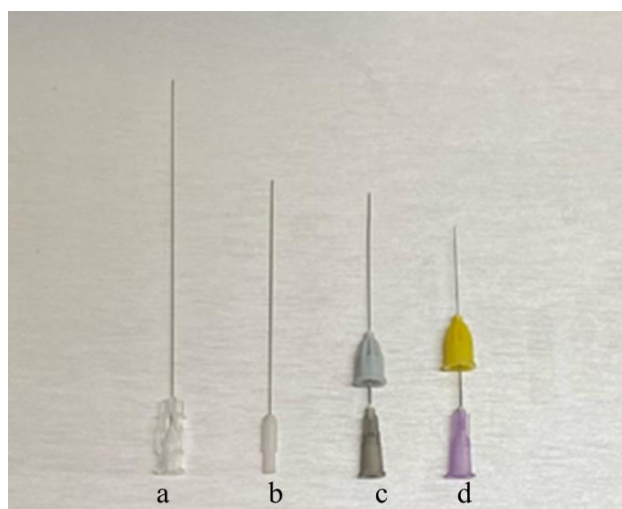


Figura 4. Agulhas utilizadas no Experimento 1. a) 27G Raquidiana, Unisis®, Fukuoka – Japão; b) 27G WTA, WTA®, Cravinhos - Brasil; c) 27G Gengival, DFL®, Rio de Janeiro - Brasil; d) 30G Gengival, DFL®, Rio de Janeiro – Brasil.

Os CCOs previamente rastreados e selecionados foram mantidos em uma placa de Petri contendo líquido folicular, sob placa aquecedora a 36°C. De acordo com o experimento, Grupos de 25 ou 50 CCOs foram colocados em uma gota (10 ou 20 µl) de solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com 0,5% albumina sérica bovina (BSA) (Figura 5a). Os CCOs foram, então, alocados por pressão negativa dentro da agulha, junto com o meio PBS. Todo o sistema foi previamente preenchido com PBS, deixando uma coluna de ar de aproximadamente 1 cm entre o conteúdo a ser injetado e o PBS do sistema.

A injeção foi realizada com o bisel da agulha voltado para baixo, penetrando-se de forma cuidadosa paralelamente ao folículo dominante, no parênquima ovariano. Durante o procedimento de injeção, avaliou-se a resistência à penetração no folículo, classificando-a em três níveis (1 – penetração fácil, 2 – resistência moderada, 3 – resistência significativa), bem como o refluxo a partir do orifício causado pela injeção, com classificações variando de 1 a 3

(1 – gota discreta, volume mínimo, 2 – gota visível, volume moderado, 3 – gota de grande volume ou jato de líquido). Após a injeção, realizou-se uma lavagem do sistema com aproximadamente 1 mL de meio PBS, e o conteúdo foi transferido para uma placa de Petri para a identificação de possíveis ovócitos retidos.

Em seguida, o folículo injetado foi puncionado e seu conteúdo foi aspirado com uso de uma agulha hipodérmica (18 G) acoplada a uma seringa de 10 mL. O conteúdo aspirado foi depositado em uma placa de Petri média (60 mm) e a seringa foi lavada com aproximadamente 5 mL de meio PBS aquecido, para garantir que não ficaram ovócitos retidos. Por fim, os CCOs foram rastreados e avaliou-se a taxa de recuperação sobre a quantidade efetivamente injetada (subtraindo-se os ovócitos retidos no sistema e o ovócito originário do folículo). Além disso, avaliou-se a taxa de desnudamento sobre o total de CCOs recuperados (Figura 5b). O ovócito foi classificado como desnudado quando mais que 50% de sua circunferência não apresentava nenhuma camada de CC ao seu redor.

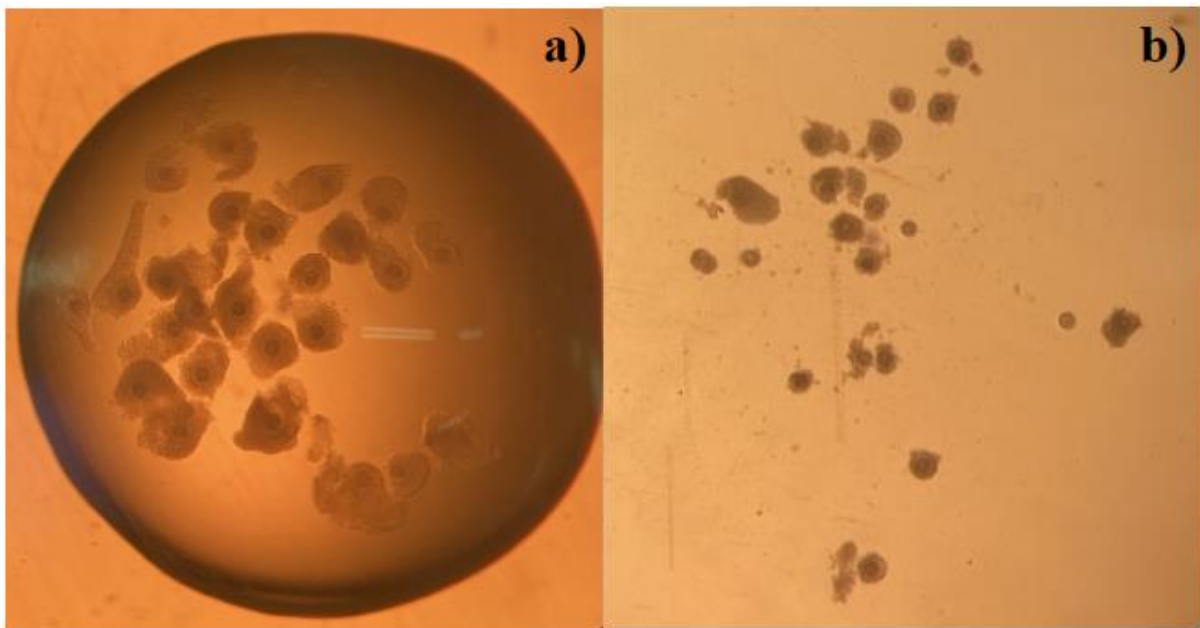


Figura 5. Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) antes e após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). a) Grupo de CCOs em gota de meio PBS, antes da injeção. b) CCOs rastreados após aspiração do folículo injetado.

2.5 Protocolo de sincronização de estro das ovuladoras

No dia 0 (D0) do protocolo, as ovuladoras receberam um implante intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest® Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brasil), associado à administração intramuscular (im) de 2,0 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®,

Tecnopec Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil). No dia 8 (D8), foi realizada a retirada do implante de progesterona e a administração intramuscular (im) de um análogo de Prostaglandina F_{2α} (500 µg de Cloprostenol sódico, ESTRON®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) para indução da luteólise. Trinta horas após a retirada do implante, foi realizada a TIFOI e, simultaneamente, foi administrado um análogo de GnRH para indução da ovulação (50mg de Lecirelina; Gestran® ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

2.6 TIFOI

A TIFOI foi realizada conforme descrito anteriormente por Sprícigo et al., (2016). Os animais foram devidamente imobilizados em um tronco de contenção e após antissepsia da região perineal, foi realizada anestesia epidural baixa com cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet®, BRAVET, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Para a injeção, foi utilizado um aparelho de ultrassom com transdutor microconvexo de 7,5 MHz acoplado a uma guia transvaginal (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil). A guia continha, paralelamente ao transdutor, um mandril montado em um sistema fechado, com uma seringa de insulina em uma extremidade e a agulha na outra.

Os CCOs foram aspirados de ovários obtidos em abatedouros e, após a aspiração e seleção, foram mantidos em grupos de 25 ou 50 em placas de 4 poços contendo fluido folicular (aproximadamente 500 µl por poço), sobre placa aquecedora a 36°C. No momento da TIFOI, os grupos de CCOs foram submetidos a duas lavagens em meio PBS e, em seguida, pipetados em um volume final de 10 µl e colocados sobre uma placa de Petri. Por pressão negativa, os CCOs foram alocados dentro da agulha da TIFOI, juntamente com a gota de meio PBS. Todo o sistema foi previamente preenchido com PBS, deixando uma coluna de ar de aproximadamente 1 cm entre o conteúdo a ser injetado e o PBS do sistema.

A guia foi inserida no fórnix vaginal do mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante e, por meio de palpação retal, o ovário foi posicionado para perfuração do fórnix vaginal e da parede do folículo. Imediatamente após, foi realizada a injeção de todo o volume de meio contendo os CCOs. A qualidade da injeção foi classificada em graus, conforme descrito por Faria et al. (2022): injeção 1: injeção no centro do folículo e visualização da entrada de todas as estruturas; grau 2: injeção na periferia do folículo e visualização da entrada das estruturas muito rápida (causando efeito de vórtice) ou muito lenta (quase imperceptível); grau 3: mais de uma perfuração no folículo e sem visualização da entrada das estruturas.

Após a TIFOI, o sistema foi lavado com meio PBS e o conteúdo foi depositado em uma placa de Petri para avaliar se ficaram ovócitos retidos no sistema. Posteriormente, as ovuladoras foram submetidas à inseminação artificial com uma dose de sêmen convencional de um reprodutor da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), adquirida em uma central de reprodução e com dados de fertilidade conhecidos. A deposição do sêmen foi realizada no corno uterino ipsilateral ao folículo dominante. A indução da ovulação foi realizada neste momento utilizando um análogo de GnRH, conforme descrito previamente.

2.7 Coleta de embriões

A coleta de embriões foi realizada 9 dias após a TIFOI (oito dias após o momento estimado da ovulação). As fêmeas foram primeiramente submetidas a exame ultrassonográfico para confirmar se havia ocorrido a ovulação e a formação do CL. As vacas que haviam ovulado foram então submetidas à coleta de embriões por meio de lavagem uterina.

Primeiramente, a vaca foi devidamente contida em um tronco e foi realizada a higienização da região perineal. Em seguida, a analgesia foi promovida por meio de anestesia epidural baixa com cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet®, BRAVET, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Para a coleta, uma sonda de Foley foi inserida via intracervical com o auxílio de um mandril e posicionada na base do corpo uterino, onde o balão foi inflado até fixá-la. Posteriormente, o mandril foi retirado e um equipo em “Y” foi acoplado à sonda de Foley, compondo o sistema fechado. Em suas outras extremidades, foram fixadas uma bolsa com meio PBS aquecido (32 a 36°C) e um filtro de coleta de embriões, sendo realizada a perfusão uterina com aproximadamente 1000 mL de meio PBS.

Terminada a coleta, o filtro foi lavado o conteúdo foi depositado em uma placa de Petri, onde as estruturas (Figura 6) foram rastreadas com auxílio de lupa estereomicroscópica. As estruturas recuperadas foram classificadas conforme sua morfologia em zona pelúcida (ZP), ovócito não fecundado (NF), embrião degenerado (DG), mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) ou blastocisto expandido (Bx). Foram avaliadas a taxa de recuperação de estruturas (contabilizando ZP, NF e DG) e a taxa de embriões com relação ao total de CCOs efetivamente injetados em cada animal. Para melhor interpretação dos resultados, avaliou-se também as taxas de recuperação de estruturas e embriões extras, ou seja, descontando-se uma estrutura ou embrião, possivelmente próprio da ovuladora.

Os embriões recuperados foram transportados até o laboratório em criotubos contendo 500 ul de meio H-SOF (SOF tamponado com HEPES), em transportadora a 38° C.



Figura 6. Estruturas recuperadas após a lavagem uterina de fêmea bovina submetida à Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI).

2.8 Maturação in vitro (MIV)

Para o grupo controle, os CCOs obtidos de ovários de abatedouro foram selecionados, lavados uma vez em meio de lavagem, composto de TCM-199 com sais de Hank, L-Glutamina e 25 mM HEPES (Gibco® BRL, Burlington, ON, Canadá), e transferidos em grupos de 25-30 para criotubos contendo de 350 μ l de meio de maturação e 250 μ l de óleo mineral. O meio de MIV era composto de TCM-199 com sais de Earl's (Gibco® BRL, Burlington, ON, Canadá) suplementado com 0,4% de BSA, 0,01 UI/mL de FSH, 0,1 mg/mL de L-glutamina, Cysteamina (0,1 mM) e antibiótico (amicacina, 0,075 mg/mL). Os CCOS foram transportados até o laboratório em transportadora a 38° C e, posteriormente, os tubos contendo os CCOs transferidos para estufa de cultivo. Os ovócitos foram maturados in vitro durante 22 a 24 horas, a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

2.9 Fecundação in vitro (FIV)

Após a maturação, os CCOs (em grupos de 25 a 30) foram lavados em meio de fecundação e transferidos para uma gota de 150 μ L do mesmo meio, em placa coberta com óleo mineral. O meio de fecundação utilizado foi o *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate* (TALP) (Parrish et al., 1995) suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 μ M de epinefrina e 10 μ g/mL de heparina. Para a realização da FIV, foi empregado sêmen de

um touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) previamente testado para PIVE. Este touro foi o mesmo utilizado para a IA das fêmeas ovuladoras submetidas à TIFOI.

A dose de sêmen foi descongelada a 36 °C durante 30 segundos e, em seguida, foi realizada a seleção dos espermatozoides viáveis por meio de centrifugação em um gradiente descontínuo de Percoll (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA), utilizando 400 µl de Percoll 90% e 400 µl de Percoll 45% em microtubo de 1,5 mL, a 9000 × g, durante 5 minutos.

O *pellet* resultante foi ressuscitado em meio TALP e centrifugado novamente a 9000 × g, durante 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* obtido foi ressuscitado em meio TALP e adicionado à gota de fecundação, alcançando uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os ovócitos e espermatozoides foram co-incubados a 38,5 °C e 5% de CO₂ em ar, por um período de 18 a 20 horas. O dia da FIV foi considerado o dia 0 (D0).

2.10 Cultivo embrionário in vitro (CIV)

Após a fecundação, os zigotos presumíveis foram parcialmente desnudados por meio de sucessivas pipetagens, lavados duas vezes em meio de cultivo embrionário e transferidos para gotas de 150 µl do mesmo meio, cobertas com óleo mineral. O meio de cultivo era composto de fluido de oviduto sintético (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,35 mM de sódio tri citrato, 2,8 mM de myo-inositol (Holm et al., 1999) e 4 mg/ml BSA. O cultivo embrionário in vitro foi realizado a 38,5 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Os embriões foram avaliados no dia 2 (D2) para a taxa de clivagem e em D6, D7 e D8 para a taxa de produção de blastocistos.

2.11 Avaliação do diâmetro dos embriões e contagem do número total de células

No oitavo dia de desenvolvimento, embriões em estágio de blastocisto expandido, provenientes da TIFOI e PIV, foram avaliados quanto ao diâmetro e ao número total de células individuais.

Para determinar o diâmetro embrionário (Figura 7a), foi realizada a medição utilizando um microscópio trinocular conectado a uma câmera (SMZ800N, Nikon Corporation, Minato, Tóquio, Japão). Posteriormente, os embriões foram lavados três vezes em PBS suplementado com 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP) e então incubados durante 15 minutos em solução de Hoechst 33324 na concentração de 1 µg/mL (1000 µl de Paraformaldeído 4% + 0,2 µl de H33342 a 5,0 mg/mL). Por fim, os embriões foram lavados três vezes em PBS/PVP, montados

em lâminas com meio antifade (Slowfade™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e observados sob um microscópio de fluorescência, utilizando filtro de comprimento de onda de excitação de 350/461 nm. Para cada blastocisto, determinou-se o número total de células individuais (núcleos azuis, Figura 7b).

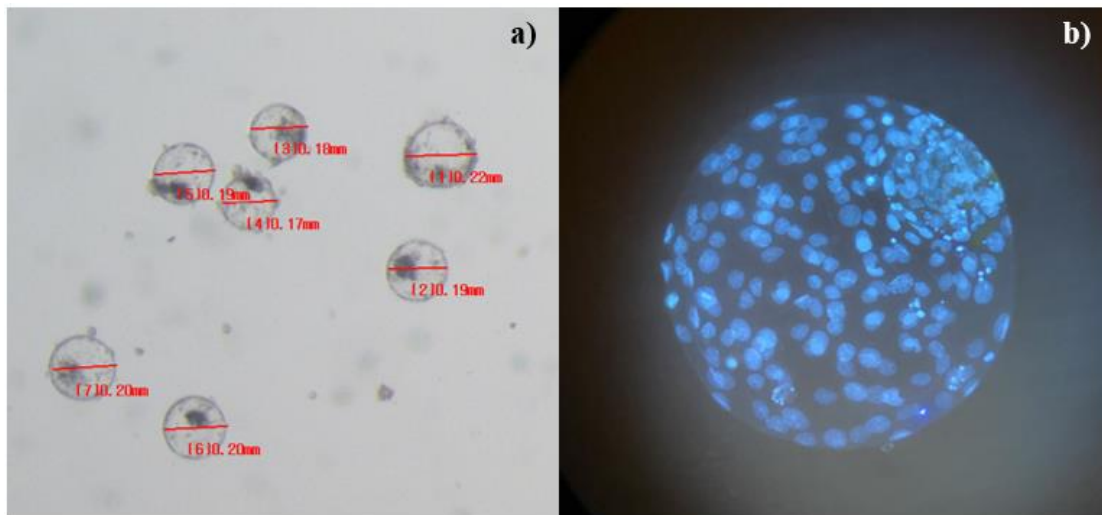


Figura 7. a) Medição do diâmetro embrionário utilizando a ferramenta integrada à câmera. b) Embrião bovino corado com Hoechst 33342 para contagem do número total de células (núcleos azuis).

2.12 Análise estatística

2.12.1 Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos após a TIFOI *in vitro*

No primeiro experimento deste estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa “Statistical Analysis System” (SAS, versão 9.4). As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas e o procedimento “MIXED” foi utilizado para análise de variância. As médias foram ajustadas pelo “LSMEANS” e comparadas, quando necessário, pela probabilidade de diferença (PDIF). A significância estatística foi declarada quando $P \leq 0,05$.

2.12.2 Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI

Neste experimento, avaliou-se a recuperação ou não de estruturas e embriões em função de dois fatores (qualidade da injeção e tratamento – T25 ou T50). O procedimento de equações de estimação generalizadas (GEE – *generalised estimating equations*, foi utilizado para avaliação de independência ou não das amostras e, devido ao baixo valor estimado de correlação entre os ovócitos, optou-se por considerar as amostras independentes. Portanto, para a análise estatística utilizou-se o modelo GLM de família binomial, popularmente conhecido por modelo de regressão logística, no Software R (versão 4.0.4).

O modelo GLM foi ajustado e dele foram calculadas as razões de chance (*odds ratio*) dos pares de tratamento, bem como seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). As comparações múltiplas entre os pares de tratamento foram feitas através do IC95%. Para que fosse mantido o nível de significância de 5% do conjunto de comparações realizadas, foi aplicado o ajuste de Bonferroni. O procedimento de comparação foi realizado de acordo com o procedimento apresentado em Bilder & Loughin (2015, p.109-110). Para interpretação das comparações múltiplas realizadas com base no IC95% das razões de chance (*odds ratio*), verificou-se se o IC95% continha ou não o valor unitário. Se o IC95% contivesse o valor unitário, considerou-se que as chances de se obter sucesso entre os tratamentos comparados podem ser as mesmas e que os tratamentos podem ter performance similar.

Para os dados de diâmetro médio e do número total de células embrionárias foi realizada análise de variância (ANOVA), com correção de Welch (correção para tamanhos de grupo desbalanceados). As médias foram comparadas, quando necessário, conforme o procedimento descrito por Herberich et al. (2010). A significância estatística foi declarada quando $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1. Efeito das condições da injeção na recuperação e qualidade de ovócitos na TIFOI in vitro

3.1.1 Medições das Agulhas

Os valores de comprimento, diâmetro interno, diâmetro externo e volume de líquido comportado pelas agulhas 27G R, 27G G, 27G W e 30G G se encontram na Tabela 1.

As agulhas 27G R, 27G G e 27G W apresentam diâmetro externo de 0,40 mm e a agulha 30G G apresenta diâmetro externo de 0,30 mm. O diâmetro interno das agulhas é: 0,28 mm - 27G R; 0,20 mm - 27G G; 0,25 mm - 27G W; e 0,14 mm - 30G G. A maior agulha em comprimento é a 27G R (90 mm), seguida pela 27G W (65 mm), 27G G (38 mm) e, por último, a 30G G (25 mm). A capacidade de líquido que cada agulha comporta foi obtida por meio de cálculo de volume, a partir dos dados de comprimento e diâmetro interno. Portanto, foram obtidos os seguintes valores: 27G R - 5,54 μ l, 27G G - 1,19 μ l, 27G W - 3,19 μ l e 30G G - 0,38 μ l.

Tabela 1. Medidas médias de diâmetro externo, diâmetro interno, comprimento e capacidade de líquido comportado em diferentes agulhas

Agulha	Diâmetro Externo (mm)	Diâmetro Interno (mm)	Comprimento (mm)	Capacidade (μ l)
27G R	0,40	0,28	90	5,54
27G G	0,40	0,20	38	1,19
27G W	0,40	0,25	65	3,19
30G G	0,30	0,14	25	0,38

27G R: 27G Raquidiana; 27G G: 27G Gengival; 27GW: 27G WTA; 30G G: 30G Gengival.

3.1.2 TIFOI em ovários de abatedouro

Antes de iniciar os testes com ovários de abatedouro, conduziu-se um teste preliminar para confirmar se haveria diferença *in vitro* entre 60 e 20 μ l quanto a taxa de recuperação e o desnudamento dos CCOs após a injeção. Os resultados mostraram que não houve diferença nem na taxa de desnudamento, nem na taxa de recuperação (Tabela 2). Portanto, optou-se por não utilizar o volume de 60 μ l nos experimentos subsequentes deste estudo.

Tabela 2. Resultados do teste preliminar avaliando o efeito de diferentes volumes de meio PBS sobre a recuperação e desnudamento dos complexos cumulus-ovócitos (CCOs) após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) (8 injeções/tratamento)

Volume de meio PBS	20 μ l	60 μ l	P-Valor
Nº total de CCOs injetados	197	198	—
Recuperação - % \pm SE	84,2 \pm 6,6	79,3 \pm 3,6	0,5113
Desnudamento - % \pm SE	17,4 \pm 4,0	26,7 \pm 4,6	0,1661

Em cada injeção, a agulha 27G Raquidiana foi carregada com 25 CCOs em 20 ou 60 μ l de meio PBS.

*P-Valor: se refere à comparação entre os tratamentos. Declarou-se diferença estatística entre os tratamentos quando $P \leq 0,05$.

Na primeira etapa do Experimento 1 avaliou-se o efeito de diferentes agulhas sobre a recuperação e a qualidade dos CCOs após a TIFOI (Tabela 3). Para isso, cinco injeções foram realizadas com cada agulha testada (27G R, 27G G, 27G W, e 30G G). Em cada injeção, a agulha foi carregada com 20 μ l de meio PBS + 0,5% BSA, contendo 25 CCOs.

A taxa de CCOs que ficaram retidos no sistema e não foram efetivamente injetados no foliculo não diferiu entre as agulhas avaliadas ($P > 0,05$). Com relação à resistência no momento da injeção, este parâmetro foi semelhante entre todas as agulhas testadas, com exceção da agulha 27G R, com a qual observou-se resistência ligeiramente maior à injeção ($P \leq 0,05$). O refluxo observado durante as injeções, classificado com 1, 2 ou 3, foi maior ($P \leq 0,05$) com a agulha 30G G do que com as agulhas 27G G e 27G R, enquanto a 27G W foi semelhante às demais.

A taxa de recuperação foi menor ($P \leq 0,05$) quando se utilizou agulha 30G G e não diferiu entre as demais. Avaliando-se o desnudamento, as agulhas 30G G e 27G G apresentaram maiores ($P \leq 0,05$) taxas do que a 27G R e a 27G W. Considerando que 27G G e 30G G apresentaram as maiores taxas de desnudamento, elas foram excluídas do próximo experimento.

Tabela 3. Eficiência de diferentes agulhas utilizadas para a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) com 25 complexos cumulus-ovócitos (CCOs), em 20 μ l de meio PBS (5 injeções/tratamento)

Variáveis	27G R	27G G	27G W	30G G	P-Valor
Nº total de CCOs*	125	125	125	125	—
CCOs retidos** - % \pm SE	0,0 \pm 0,0	4,0 \pm 4,0	2,4 \pm 1,6	1,6 \pm 1,0	0,6464
Resistência (1 a 3), média \pm SE	1,8 \pm 0,2 ^a	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	0,0002
Refluxo (1 a 3), média \pm SE	1,8 \pm 0,6 ^b	1,4 \pm 0,2 ^b	2,6 \pm 0,4 ^{ab}	3,0 \pm 0,0 ^a	0,0144
Recuperação - % \pm SE	83,2 \pm 4,1 ^a	79,0 \pm 6,1 ^a	82,5 \pm 4,6 ^a	63,5 \pm 6,8 ^b	0,0494
Desnudamento - % \pm SE	27,0 \pm 8,6 ^b	66,5 \pm 10,2 ^a	34,1 \pm 8,5 ^b	84,0 \pm 6,0 ^a	0,0002

27G R: 27G Raquidiana; 27G G: 27G Gengival; 27G W: 27G WTA; 30G G: 30G Gengival.

*Nº total de CCOs: número total de CCOs utilizados, considerando-se as 5 injeções.

**Porcentagem de CCOs retidos no sistema.

***P-Valor: se refere à comparação entre os tratamentos. Declarou-se diferença estatística quando $P \leq 0,05$.

^{a, b}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).

Na segunda etapa, avaliou-se o efeito do volume de meio PBS e da quantidade de CCOs utilizados para a injeção. Para isso, comparou-se 25 e 50 CCOs, utilizando 10 ou 20 μ l de meio PBS e as agulhas 27G R e 27G W.

Avaliando-se apenas o efeito da agulha utilizada para a injeção, independentemente do número de CCOs injetados ou do volume, foi possível observar maior ($P = 0,0070$) taxa de desnudamento com a agulha 27G W (30,0%) do que com a agulha 27G R (18,8%). Além disso, avaliando-se diferentes volumes, independentemente do número de CCOs injetados, os resultados mostraram (Tabela 4) que quando se utilizou a agulha 27G R, houve efeito do volume na taxa de recuperação ($P \leq 0,05$), sendo maior com 10 μ l do que com 20 μ l.

Adicionalmente, houve efeito da interação entre agulhas, volume e quantidade de CCOs para a taxa de retenção ($P \leq 0,05$). A maior taxa de retenção foi quando a 27G W foi utilizada com 25 CCOs em 10 μ l (Tabela 5). Nenhuma outra diferença foi encontrada nas demais variáveis analisadas.

Tabela 4. Efeito da interação entre diferentes agulhas (27 G R e 27G W) e volumes de meio veículo (10 e 20µl) na eficiência da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 14 injeções/tratamento

Variáveis	Agulha				P-Valor***
	27G R		27G W		
	Volume (µl)				
	10	20	10	20	
Nº total de CCOs*	525	525	525	525	–
CCOs retidos** - % ± SE	6,2 ± 3,7	5,1 ± 1,1	8,8 ± 2,5	3,9 ± 1,7	0,3010
Resistência (1 a 3), média ± SE	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0000
Refluxo (1 a 3), média ± SE	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,0939
Recuperação - % ± SE	85,8 ± 3,4 ^a	70,1 ± 4,3 ^b	77,0 ± 5,5 ^{ab}	82,1 ± 4,0 ^{ab}	0,0221
Desnudamento - % ± SE	15,3 ± 2,3	22,4 ± 5,6	30,0 ± 3,9	30,0 ± 2,7	0,3736

27G R: 27G Raquidiana; 27G W: 27G WTA.

*Número total de CCOs utilizados, considerando-se as 14 injeções.

**Porcentagem de CCOs retidos no sistema.

***P-Valor: se refere à comparação entre os tratamentos. Declarou-se diferença estatística entre os tratamentos quando $P \leq 0,05$.

^{a, b}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).

Tabela 5. Efeito da interação entre diferentes agulhas (27 G R e 27G W), volumes (10 e 20µl) e quantidades (25 e 50) complexos cumulus-ovócitos (CCOs) na eficiência da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 7 injeções/tratamento

Variáveis	27G R				27G W				P-Valor**
	10 µl		20 µl		10 µl		20 µl		
	N° CCOs								
	25	50	25	50	25	50	25	50	
N° total de CCOs*	175	350	175	350	175	350	175	350	-
CCOs retidos** - % ± SE	5,1 ± 2,4 ^b	7,4 ± 2,7 ^{ab}	5,7 ± 1,9 ^b	4,5 ± 1,6 ^b	13,2 ± 5,4 ^a	4,3 ± 1,5 ^b	1,8 ± 0,8 ^b	6,1 ± 1,4 ^b	0,0244
Resistência - média ± SE	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0000
Refluxo - média ± SE	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,7334
Recuperação - % ± SE	82,1 ± 4,9	89,5 ± 4,8	68,3 ± 7,4	71,8 ± 5,2	73,8 ± 6,4	80,2 ± 9,3	80,3 ± 7,4	83,9 ± 3,7	0,9544
Desnudamento - % ± SE	16,8 ± 4,2	13,8 ± 2,3	26,5 ± 9,8	18,3 ± 5,8	31,5 ± 6,3	28,5 ± 5,2	27,2 ± 2,3	32,8 ± 4,9	0,3870

27G R: 27G Raquidiana; 27G W: 27G WTA.

*Número total de CCOs utilizados, considerando-se as 7 injeções.

**Porcentagem de CCOs retidos no sistema.

***P-Valor: se refere à comparação entre os tratamentos. Declarou-se diferença estatística entre os tratamentos quando $P \leq 0,05$.

^{a, b}: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).

3.2 Experimento 2. Efeito das condições da injeção na recuperação de embriões após a TIFOI

Após os testes preliminares utilizando ovários provenientes de abatedouro, foi realizada a avaliação *in vivo*. Para isso, foi utilizada a agulha 27G Raquidiana, com 10 µl de meio PBS e 25 ou 50 CCOs. A agulha selecionada apresentou as maiores taxas de recuperação de CCOs e as menores taxas de desnudamento nos testes *in vitro*, preservando a integridade das camadas de CC. O volume de 10 µl foi o que melhor se adequou à agulha 27G Raquidiana, pois quando utilizado com a agulha em questão, as taxas de recuperação foram significativamente maiores.

3.2.1 Resposta ao protocolo de sincronização de estro

Das 37 vacas submetidas ao protocolo de sincronização de estro, 23 apresentaram um folículo dominante no D9 do protocolo, dia em que foi realizada a TIFOI (62,2% de resposta). A resposta ao protocolo por réplica foi de 57,1% na réplica 1 (8 de 14 animais), 66,6% na réplica 2 (8 de 12 animais) e 63,6% na réplica 3 (7 de 11 animais).

3.2.2 TIFOI e coleta de embriões

O número total de animais utilizados por tratamento, bem como o total de CCOs injetados e a porcentagem de ovócitos que ficaram retidos no sistema se encontram na Tabela 6. Nas réplicas 1 e 2, todas as vacas que responderam ao protocolo foram submetidas à TIFOI. Na réplica 3, das 7 vacas com folículo dominante, 1 foi descartada pois o folículo extravasou antes da injeção. Subtraindo-se a ovuladora descartada devido ao problema mencionado, a TIFOI foi realizada em 11 animais do tratamento “T25” e 11 animais do tratamento “T50”. No momento da injeção, um ovócito do tratamento “T50” não foi aspirado junto com o volume de meio PBS e ficou na placa.

Tabela 6. Taxa de retenção de complexos cumulus-ovócitos (CCOs) no sistema utilizando 25 (T25) ou 50 CCOs (T50) para a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), em 3 réplicas

Tratamento	Nº Animais	Total de CCOs Injetados*	CCOs Retidos	Efetivamente Injetados
T25	11	275	3 (1,1%)	272 (98,9%)
T50	11	549	10 (1,8%)	539 (98,2%)

*Subtraiu-se do total de CCOs injetados um CCO que não foi alocado no sistema de injeção, do tratamento “T50”.

Do total de ovuladoras que foram utilizadas para a TIFOI, três do tratamento “T50” não foram submetidas à coleta de embriões, pois uma teve o folículo esvaziado após a injeção e nas outras duas não foi possível ultrapassar a cérvix durante a coleta de embriões. Das onze ovuladoras do tratamento “T25”, duas não foram submetidas à coleta de embriões, pois uma teve o folículo esvaziado após a injeção e a outra não foi possível ultrapassar a cérvix durante a coleta. Portanto, a coleta de embriões foi realizada em 9 ovuladoras do tratamento “T25” e 8 ovuladoras do tratamento “T50”.

A recuperação total de estruturas e de embriões, bem como a recuperação de estruturas e de embriões extras (taxa de recuperação após a exclusão de uma estrutura ou embrião, possivelmente próprio da ovuladora) é apresentada na Tabela 7. As taxas de recuperação foram calculadas com base no tratamento (T25 ou T50) e na qualidade da injeção (1 a 3). Não foram registradas injeções classificadas como 3, neste experimento.

Tabela 7. Recuperação de estruturas totais e estruturas extras após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) em grupos de 25 (T25) ou 50 (T50) complexos cumulus-ovócitos (CCOs) e com injeções classificadas como 1 (boa) ou 2 (regular), em 3 réplicas

Tratamento*	Nº Animais	Nº CCOs**	Estruturas Recuperadas***							Recuperação Total de Estruturas	Recuperação de Estruturas Extras****	Recuperação Total de embriões	Recuperação de Embriões Extras****		
			ZP	NF	DG	Mo	Bi	Bl	Bx						
T25_1	8	198	_	18	21	_	6	3	6	54	27,3%	24,2%	15	7,6%	5,1%
T25_2	1	25	_	3	1	_	_	_	_	4	16,0%	12,0%	0	0,0%	0,0%
T50_1	4	197	_	15	16	_	1	6	5	43	21,8%	20,8%	12	6,1%	5,6%
T50_2	4	199	4	22	7	_	_	_	2	35	17,6%	16,1%	2	1,0%	0,0%
Total	17	619	4	58	45	0	7	9	13	136	22,0%	20,0%	29	4,7%	3,4%

*T25_1: tratamento T25 com injeção de qualidade 1; T25_2: tratamento T25 com injeção de qualidade 2; T50_1 tratamento T50 com injeção de qualidade 1; T50_2: tratamento T50 com injeção de qualidade 2. **Nº CCOs: número total de CCOs injetados, descontando aqueles retidos no sistema de TIFOI e levando em consideração as três réplicas. ***ZP: Zona pelúcida; NF: Ovócito não fecundado; DG: embrião degenerado; Mo: Mórula; Bi: Blastocisto inicial; Bl: Blastocisto; Bx: Blastocisto expandido. ****Taxa de recuperação após a exclusão de uma estrutura ou embrião, possivelmente próprio da ovuladora.

A partir dos dados obtidos, o modelo GLM (regressão logística) foi ajustado e dele foram calculadas as razões de chance (*odds ratio*) dos pares de tratamento para a recuperação de estruturas, bem como seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) (Figura 8). Os resultados apontam que, com base na amostra analisada, não se encontrou evidência de que haja diferença significativa ao nível de 5% de que as chances (*odds*) de recuperação de estruturas dependam do tratamento aplicado (T25 ou T50) ou da qualidade da injeção (1 ou 2).

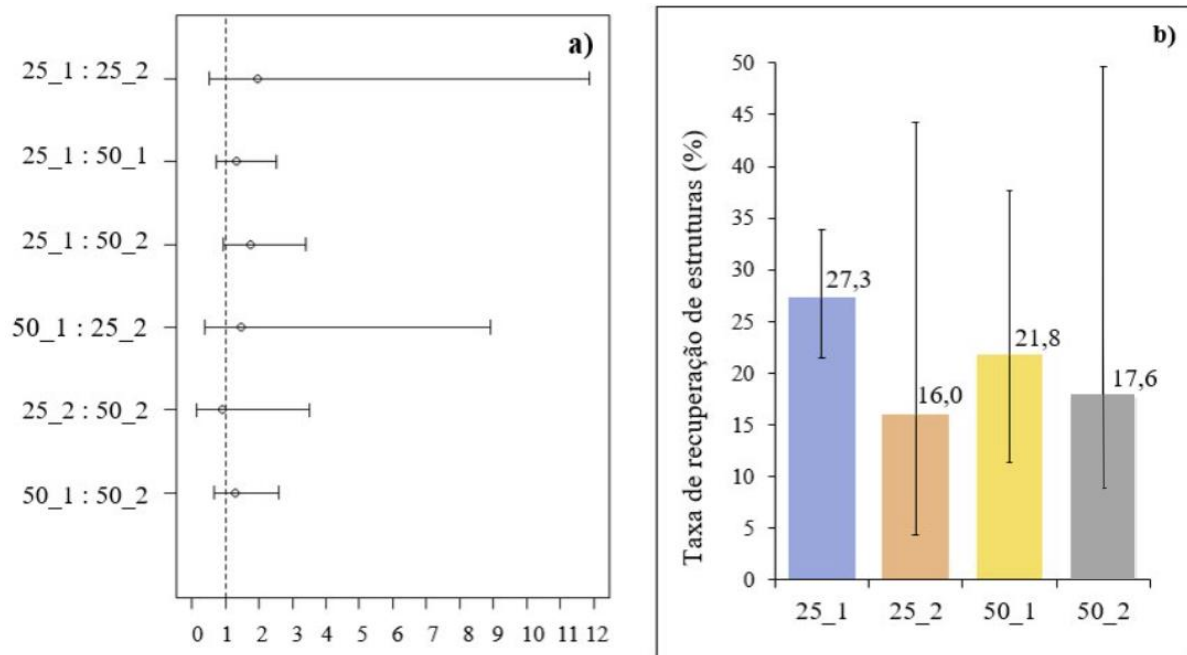


Figura 8. a) Razões de chance (*odds ratio*) dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2 sobre a recuperação total de estruturas após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). O círculo vazado “O” indica o *odds ratio* (OR) e a linha horizontal delimita o limite inferior (OR-LI) e o limite superior (OR-LS) do Intervalo de confiança 95% (IC95%). Para interpretação das comparações múltiplas, verifica-se se o IC95% contém ou não o valor unitário. Se o IC95% contiver o valor unitário, considera-se que os tratamentos podem ter performance similar. b) Taxa de recuperação total de estruturas dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2.

Além disso, foi avaliada a recuperação de embriões conforme o tratamento e a qualidade da injeção (Figura 9). Neste experimento, não houve recuperação de embriões do tratamento "T25" com qualidade da injeção 2 (T25_2). Utilizando o modelo GLM (regressão logística) para calcular as razões de chance (*odds ratio*) dos pares de tratamento, juntamente com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), os resultados indicam que, com base na amostra analisada, há evidência significativa, ao nível de 5%, de que as chances (*odds*) de recuperação de embriões são afetadas pela qualidade da injeção. Observou-se recuperação semelhante entre "T25_1" e "T50_1", mas menor com "T50_2".

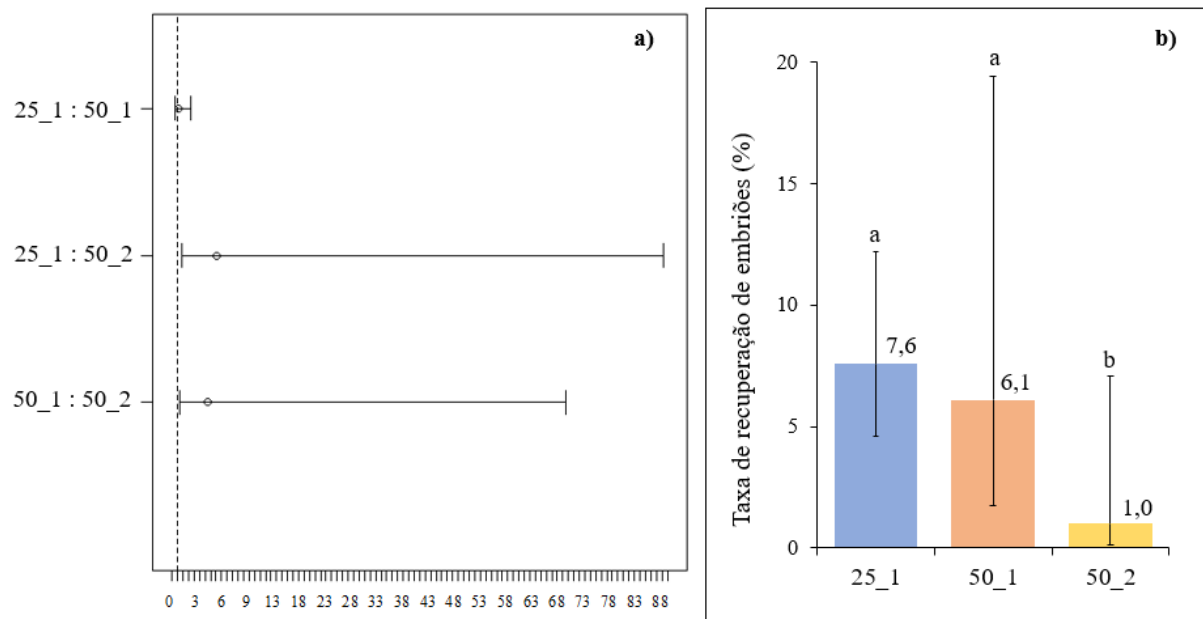


Figura 9. a) Razões de chance (*odds ratio*) dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2 sobre a recuperação total de embriões após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI). O círculo vazado “O” indica o *odds ratio* (OR) e a linha horizontal delimita o limite inferior (OR-LI) e o limite superior (OR-LS) do Intervalo de confiança 95% (IC95%). Para interpretação das comparações múltiplas, verifica-se se o IC95% contém ou não o valor unitário. Se o IC95% contiver o valor unitário, considera-se que os tratamentos podem ter performance similar. b) Taxa de recuperação total de embriões dos tratamentos T25 e T50 com injeções classificadas como 1 ou 2. ^{a, b}: letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Conforme mostrado na Tabela 8, a estimativa pontual de *odds ratio* apresentada pelo modelo GLM foi de que a injeção “50_1” (tratamento 50 com qualidade 1) apresenta 6,4 vezes mais chance de recuperação de embriões quando comparado ao mesmo tratamento, mas com injeção de qualidade 2 (T50_2). Como o Intervalo de Confiança (IC95%) não contém o intervalo unitário, a amostra analisada sinalizou que é plausível haver diferença “real” na chance de sucesso de 50_1 em relação a 50_2. O mesmo acontece quando se compara a estimativa pontual de *odds ratio* de “25_1” e “50_2”.

Tabela 8. Resultados das razões de chance (*odds ratio*) para os pares de combinação de tratamento (T25 ou T50) e qualidade da injeção (1 ou 2) com base no Modelo GLM (regressão logística) ajustado para os dados da amostra

Comparação	OR (<i>odds ratio</i>)	Intervalo de confiança (IC95%) (com ajuste de Bonferroni)	
		OR-Limite Inferior (95%)	OR-Limite Superior (95%)
25_1 : 50_1	1,3	0,5	3,4
25_1 : 50_2	8,1	1,8	89,3
50_1 : 50_2	6,4	1,3	71,6

Para interpretação das comparações múltiplas realizadas com base no IC95% das razões de chance (*odds ratio*), verifica-se se o IC95% contém ou não o valor unitário. Se o IC95% contiver o valor unitário, considera-se que os tratamentos podem ter performance similar.

3.2.3 Produção in vitro de embriões do grupo MIV Controle

A cada réplica/dia de manipulação das ovuladoras utilizadas para produção de embriões TIFOI, dois grupos de 25 a 30 ovócitos foram submetidos à maturação, fecundação e cultivo embrionário in vitro. O desenvolvimento foi acompanhado em D2 para a taxa de clivagem e em D6, D7 e D8 para a taxa de produção de blastocistos. Ao todo, 178 ovócitos foram utilizados. Os resultados da produção de embriões se encontram na tabela 9.

Tabela 9. Produção in vitro de embriões a partir de complexos cumulus-ovócitos (CCOs) obtidos de ovários de abatedouro e utilizados como controle, avaliados nos dias (D) 2, 7 e 8 de cultivo

Número Total CCOs	Taxa Clivagem D2	CCOs >4 células	Blastocistos D6	Blastocistos D7	Blastocistos D8
178	141 (79,2%)	87 (61,7%)	5 (2,8%)	37 (20,8%)	43 (24,2%)

Os dados se referem ao total de ovócitos do grupo MIV controle, considerando-se 3 réplicas.

3.2.4 Avaliação do diâmetro dos embriões e contagem do número total de células

No oitavo dia de desenvolvimento, embriões em estágio de blastocisto expandido (estágio 7) (Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões) foram avaliados quanto ao diâmetro e ao número total de células (Tabela 10). Para estas avaliações, utilizou-se os embriões provenientes da TIFOI e do grupo MIV Controle. Alguns embriões foram avaliados quanto ao diâmetro, mas não quanto ao número total de células. Estes embriões encontravam-se contraídos, impedindo a correta visualização das células para contagem. Não houve diferença

estatística entre os embriões produzidos in vivo pela TIFOI ou PIV, com relação ao diâmetro médio e ao número total de células.

Tabela 10. Média do diâmetro e do número total de células de embriões produzidos in vivo após a Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) ou in vitro (PIV), em estágio de blastocisto expandido, no 8º dia do desenvolvimento

Grupo	Embriões medidos (nº)	Diâmetro médio (μm) \pm SE	P-Valor*	Embriões corados (nº)	Média de células (nº) \pm SE	P-Valor*
TIFOI	16	175,0 \pm 15,1	0,73	14	124,2 \pm 22,1	0,21
PIV	21	179,1 \pm 21,0		12	141,3 \pm 28,9	

*P-Valor: se refere à comparação entre os tratamentos. Considerou-se diferença estatística quando $P \leq 0,05$.

4 DISCUSSÃO

A TIFOI surgiu como uma alternativa aos sistemas utilizados até o momento para a produção de embriões bovinos, promovendo a rápida multiplicação de fêmeas bovinas sem o uso de hormônios superestimulantes e em uma condição inteiramente *in vivo*, dispensando a onerosa estrutura laboratorial da PIVE (Sprícigo et al., 2016). No entanto, os resultados obtidos até o momento não são satisfatórios para sua aplicação em escala comercial. A falta de compreensão sobre os fatores que contribuem para essa baixa eficiência destaca a necessidade de uma análise detalhada de cada etapa do processo. Este estudo objetivou avaliar como as condições utilizadas para a injeção, propriamente dita, podem afetar a eficiência da técnica.

No primeiro experimento, foram conduzidos testes em ovários provenientes de abatedouros, explorando os efeitos de diferentes agulhas, volumes de meio PBS e quantidades de CCOs injetados. Com relação à agulha utilizada para a injeção, estudos anteriores em bovinos utilizaram agulhas de diferentes calibres: 24G (Simões et al., 2021), 25G (Bergfelt et al., 1998; Andriikova et al., 2020), 26G (Kassens et al., 2015; Hoelker et al., 2017) e 27G (Sprícigo et al., 2016; Faria et al., 2021). Vale destacar que, até o momento, não existe uma padronização neste aspecto. Em uma pesquisa recente, constatou-se que após a injeção, ocorre uma diminuição no diâmetro do folículo (Faria et al., 2022). Isto poderia ter implicações potenciais nas taxas de recuperação após a TIFOI, pois há a possibilidade de que esta redução seja associada ao extravasamento de fluido folicular contendo os ovócitos injetados na cavidade abdominal. Portanto, pode-se supor que o diâmetro da agulha deve ser o menor possível para que a penetração da parede do folículo ocorra sem causar prejuízos à sua estrutura. Por outro lado, a agulha deve comportar os CCOs sem causar a remoção das CC. Neste estudo, avaliaram-se agulhas de diferentes mensurações (27G R, 27G G, 27G W e 30G G) quanto à recuperação e qualidade dos CCOs após a TIFOI.

Outro fator que poderia contribuir para o extravasamento de fluido folicular ou possivelmente a perda das estruturas injetadas é o volume de meio utilizado para injeção. Até o momento, contudo, nenhum estudo avaliou o uso de volumes menores de meio veículo. Dado

que até o momento utilizamos em nosso laboratório até 60 μ l, sem um volume fixo, realizamos testes preliminares comparando 20 e 60 μ l. Os resultados mostraram que não houve diferença na taxa de recuperação ou no desnudamento dos CCOs injetados. Com base nessa observação, optamos por excluir o uso de 60 μ l nos experimentos deste estudo.

Na primeira etapa do experimento 1, avaliou-se as 4 agulhas com um volume fixo de 20 μ l meio PBS e 25 CCOs. De acordo com os resultados, foi possível observar resistência ligeiramente maior com a agulha 27G R no momento da injeção. No entanto, esta observação não foi associada a um maior refluxo a partir do orifício formado ou menores taxas de recuperação. Foi evidenciado que as agulhas 27G G e 30G G apresentaram elevadas taxas de desnudamento dos CCOs, sendo que, em alguns casos, esse fenômeno foi acompanhado por injúrias mecânicas ao ooplasma, identificadas por uma aparência mais clara e por fragmentações. Este achado pode ser possivelmente atribuído ao menor diâmetro interno dessas agulhas, sendo 0,20 mm e 0,14 mm para 27G G e 30G G, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Falchi et al. (2022) ao utilizar a agulha de calibre 30G na TIFOI em espécies ovinas. No presente estudo, foi observado também maior refluxo e menores taxas de recuperação com a agulha 30G G e, com base nessas conclusões, optou-se por excluir as agulhas 27G G e 30G G da próxima etapa.

Na segunda etapa do experimento 1, avaliou-se as agulhas 27G R e 27G W, com 25 ou 50 CCOs em 10 ou 20 μ l de meio veículo. Ao analisar apenas o efeito da agulha, independentemente do número de ovócitos injetados ou do volume de meio empregado, observou-se menor taxa de desnudamento com a agulha 27G R, em comparação com a 27G W. Este resultado poderia ser explicado pelo fato de que a agulha em questão possui o maior diâmetro interno entre as testadas, 0,28 mm. De todas as variáveis utilizadas, considerou-se a de maior importância neste estudo a taxa de desnudamento, visto que as CC têm um importante papel durante a maturação ovocitária (Eppig, 1991; Ali & Sirard, 2005; Auclair et al., 2013) e a que a sua remoção pode afetar significativamente as taxas de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário (Zhang et al., 1995). Portanto, a agulha 27G R foi selecionada para a avaliação in vivo, uma vez que teve altas taxas de recuperação e demonstrou preservar de maneira mais eficaz a integridade dos CCOs injetados.

É importante salientar que, embora esta agulha tenha um impacto menor na qualidade dos CCOs após a injeção, em comparação com demais agulhas testadas neste estudo, ainda há ocorrência de desnudamento em parte dos CCOs utilizados. Além disso, mesmo nos ovócitos que não são desnudados, observou-se uma redução significativa no número de camadas de CC, o que poderia comprometer sua competência de desenvolvimento subsequente. Uma possível

abordagem para lidar com esse problema, buscando não penalizar o ovócito, seria utilizar uma agulha com um diâmetro ligeiramente maior, mas é importante reconhecer que isso poderia levar a um aumento do extravasamento de fluido folicular e, conseqüentemente, à perda de ovócitos.

O volume de 10 µl mostrou-se mais adequado para a agulha 27G R, evidenciado pela maior taxa de recuperação em comparação com o uso de 20 µl com a mesma agulha. É relevante ressaltar que o volume selecionado é notavelmente inferior aos utilizados em estudos anteriores, que frequentemente empregaram entre 60 a 200 µl de meio veículo para a injeção dos CCOs (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andriikova et al., 2020; Faria et al., 2021). No entanto, no presente estudo, hipotetizou-se que a utilização do volume mínimo de meio veículo capaz de conter até 50 CCOs evitaria perturbações ao ambiente intrafolicular. Além disso, com a exceção de Falchi et al. (2022), que empregaram 5 µl de meio veículo para a TIFOI em espécies ovinas, nenhum estudo investigou, em bovinos, a utilização de volumes menores.

É importante pontuar que o propósito deste primeiro experimento foi limitar o número de tratamentos a serem avaliados na etapa in vivo, uma vez que em experimentos envolvendo animais há limitações no que se refere ao número de matrizes disponíveis para utilização, o que tornaria inviável a avaliação in vivo de um número elevado de tratamentos neste estudo. Portanto, com base nos resultados dos testes preliminares com ovários provenientes de abatedouros, optou-se por utilizar a agulha 27G R com 10 µl de meio PBS para a avaliação in vivo, variando o número de CCOs (tratamentos T25 e T50).

Os resultados mostraram que a quantidade de ovócitos injetados não teve impacto na recuperação de estruturas, tampouco na recuperação de embriões após a TIFOI. Isso sugere que seria possível utilizar uma quantidade maior para a injeção, como 50 CCOs, sem prejudicar a eficácia da técnica. A taxa de recuperação de estruturas (incluindo ovócitos não fecundados e embriões degenerados) obtida neste estudo foi semelhante à relatada por Andriikova et al. (2020) (22,0% vs. 22,5%, respectivamente), porém menor do que as reportadas por Sprícigo et al. (2016) (47,6%), Kassens et al. (2015) (35,2%) e Hoelker et al. (2017) (38,5%). A taxa de recuperação de embriões foi notavelmente inferior às obtidas em estudos anteriores, sendo de 4,7% neste estudo em comparação com a média de 10 a 12% (Kassens et al., 2015; Sprícigo et al., 2016; Andriikova et al., 2020) relatada anteriormente. Além disso, a taxa de blastocistos foi consideravelmente inferior àquela dos embriões PIV e empregados como controle, neste experimento (24,2%).

Um fator que pode ter contribuído para a menor taxa de recuperação de embriões em comparação aos estudos anteriores é a sincronização entre o momento da ovulação e a

existência de espermatozoides aptos à fecundação nos reservatórios da tuba uterina. Neste estudo, a inseminação artificial foi realizada juntamente com a TIFOI e a indução da ovulação. Quando um análogo de GnRH é utilizado para induzir a ovulação, as ovulações geralmente ocorrem, em média, entre 24 a 32 horas depois (Pursley et al., 1995). Considerando que a fertilidade do sêmen diminui gradualmente após algumas horas e é mantida por até cerca de 24 horas (Hafez & Hafez, 2000), a menor taxa de embriões aqui registrada poderia ser atribuída à redução do potencial de fecundação dos espermatozoides dentro dessa janela de tempo.

Outra possível explicação para a baixa taxa de embriões observada no presente estudo é o envelhecimento dos CCOs injetados durante o intervalo de tempo entre a realização da TIFOI e o momento em que ocorreu a ovulação nas fêmeas utilizadas. Faria et al. (2022) demonstraram que um período de maturação intrafolicular de vinte e duas horas, após a indução da ovulação, foi adequado para os ovócitos completarem a maturação nuclear. No entanto, um período de maturação intrafolicular prolongado (28 horas) resultou na degeneração dos ovócitos injetados, conforme observado no estudo de Simões et al. (2021). Como não monitoramos o momento da ovulação, é possível que tenha ocorrido tardiamente nas fêmeas utilizadas, levando ao envelhecimento dos CCOs.

De todas as estruturas coletadas, 54,4% eram embriões clivados em nosso estudo, um número muito menor ao relatado em estudos anteriores por Sprícigo et al. (2016) (87,5%) e Kassens et al. (2017) (83,2%). Com base nas hipóteses previamente mencionadas, a alta porcentagem de ovócitos não fecundados aqui relatada (42,6%) pode indicar a necessidade de algum ajuste no protocolo de sincronização ou no horário da inseminação das ovuladoras. Por exemplo, se a indução da ovulação com um análogo de GnRH tivesse sido realizada algumas horas antes da TIFOI, o tempo de permanência dos CCOs no folículo seria reduzido, o que poderia ser uma abordagem para lidar com o problema do possível envelhecimento dos CCOs. Uma abordagem para lidar com a possível redução do potencial de fecundação do sêmen utilizado, seria realizar uma segunda IA na manhã seguinte. No entanto, optou-se por realizar uma única IA, simultaneamente à TIFOI, para evitar manipulação excessiva do trato reprodutivo das ovuladoras após o procedimento.

Além disso, é importante considerar que estudos anteriores (Sprícigo et al., 2016; Hoelker et al., 2017; Andriikova et al., 2020) apresentaram diferenças em várias etapas do procedimento, como a seleção das ovuladoras, que pode envolver critérios como a avaliação da irrigação do folículo ovariano, o protocolo de sincronização, o tipo de meio veículo utilizado, entre outros. Além disso, também houve diferenças quanto às raças das ovuladoras, que podem ser *Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus* e o estado metabólico desses animais, por exemplo.

Neste estudo, não foi observado melhorias na taxa de recuperação embrionária após a TIFOI. Além disso, identificamos uma considerável variabilidade nas taxas de recuperação entre as ovuladoras individuais. Das 17 ovuladoras submetidas à TIFOI, 12 resultaram na recuperação de estruturas (71% dos animais), enquanto apenas 8 (47%) resultaram na recuperação de blastocistos. Um aspecto a ser considerado é que, dentre os embriões recuperados, 41,4% foram provenientes de uma mesma fêmea (12 de 29 embriões). Isso enfatiza a importância de investigar outros fatores que possam influenciar o sucesso da técnica, incluindo as características específicas das fêmeas selecionadas.

Embora a quantidade de ovócitos utilizada não tenha impactado a recuperação total de estruturas ou embriões, houve evidência significativa de que as chances de recuperação de embriões são afetadas pela qualidade da injeção. Injeções classificadas como boas resultaram em maiores chances de recuperação de embriões em comparação com injeções de qualidade inferior. Nossos resultados corroboram com os de Faria et al. (2022), que observaram uma maior taxa de coleta em injeções classificadas com grau 1, em comparação às de grau 2 e 3. Estes achados podem indicar que a taxa de recuperação de embriões está associada à técnica de transferência intrafolicular de forma geral e que a eficácia da injeção em si influencia o folículo, possivelmente contribuindo para a eficiência final da técnica.

Por fim, a análise de diâmetro embrionário e número total de células indicou que estes parâmetros foram semelhantes entre embriões produzidos *in vivo* pela TIFOI ou PIV, na amostra analisada. No entanto, embora o diâmetro e o número total de células embrionárias servirem como indicadores de qualidade (Inaba et al., 2016), apenas esses parâmetros foram considerados para avaliar a qualidade embrionária neste estudo. Portanto, futuras pesquisas podem abordar outros parâmetros para analisar o impacto do sistema de cultivo utilizando a técnica de TIFOI na qualidade dos embriões produzidos, como a quantificação de lipídios e a atividade mitocondrial, a porcentagem de células apoptóticas, a viabilidade após a criopreservação, as taxas de prenhez após a transferência, entre outros.

5 CONCLUSÃO

A partir dos testes com ovários provenientes de abatedouro (etapa *in vitro*), foi possível concluir que a agulha 27G R com 10 μ l de meio PBS foi a mais adequada para utilização na TIFOI. Com o uso desta agulha houve preservação mais eficaz da integridade dos CCOs e o volume de 10 μ l mostrou-se o mais adequado para a agulha utilizada, promovendo uma maior taxa de recuperação. Na avaliação *in vivo*, apesar de não observarmos melhorias significativas na taxa de recuperação embrionária após a TIFOI, a análise indicou que o número de CCOs injetados não afetou a recuperação de estruturas ou de embriões, mas injeções classificadas como boas apresentaram maiores chances de recuperação de embriões. Além disso, a comparação entre embriões produzidos pela TIFOI e pela PIV mostrou similaridade quanto ao diâmetro embrionário e número total de células, sugerindo uma equivalência na qualidade embrionária, considerando estes parâmetros.

6 REFERÊNCIAS

- ALI, A.; SIRARD, M. A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 303–310, 2005.
- ANDRLIKOVA, M.; BINA, V.; KOS, V.; LOPATAROVA, M.; MARKOVA, B.; STENCLOVA, L.; CECH, S. Intrafollicular oocyte transfer in cattle - A technical report. **Acta Veterinaria Brno**, v. 89, n. 1, p. 11–17, 2020.
- AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 6, p. E599–E613, 2013.
- BARNWELL, C. V; FARIN, P. W.; WHISNANT, C. S.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52, p. 75–81, 2015.
- BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P. L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 250–260, 2010.
- BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 15–25, 1998.
- BILDER, C. R.; LOUGHIN, T. M. **Analysis of categorical data with R**. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375–1385, 2001.
- DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.
- DRIVER, A. M.; PEÑAGARICANO, F.; HUANG, W.; AHMAD, K. R.; HACKBART, K. S.; WILTBANK, M. C.; KHATIB, H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1185, 2012.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; MCCOSKI, S. R. Board invited review: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555–2568, 2019.

ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 659–673, 2000.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays**, v. 13, n. 11, p. 569–574, 1991.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 2, p. 186–195, 2001.

FALCHI, L.; PIVATO, I.; LEDDA, M.; MELOSU, V.; SCANU, A.; PAU, S.; LEDDA, S.; ZEDDA, M. T. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT): Potential feasibility in the ovine species. **Theriogenology**, v. 179, p. 7–13, 2022.

FARIA, O. A. C.; KAWAMOTO, T. S.; DIAS, L. R. O.; FIDELIS, A. A. G.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M. C.; GOMES, A. C. M. M.; SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. Maturation system affects lipid accumulation in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 5, p. 372–380, 2021.

FARIA, O. A. C.; KUSSANO, N. R.; DE FARIA, L. C.; DE CASTRO, D. B. P.; MARTINS, L. P.; SPRICIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. FACTORS AFFECTING INTRAFOLICULAR TRANSFER OF IMMATURE OOCYTES (IFIOT) RESULTS: DOES THE INJECTION MATTERS? **Animal Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 0–0, 2022.

FIDELIS, A. A. G.; DE OLIVEIRA FERNANDES, G.; MELO, F. R.; DE OLIVEIRA LEME, L.; ADONA, P. R.; KAWAMOTO, T. S.; DODE, M. A. N. Ethanolic extract of dried leaves from the cerrado biome increases the cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA, S. A.; DIÓGENES, M. N.; DODE, M. A. N. Effect of insulin-transferrin-selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during in vitro maturation on in vitro bovine embryo development. **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 890–899, 2016.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Transport and Survival of Gametes. *Em*: **Reproduction in Farm Animals**. Hoboken: Wiley, 2000. p. 82–95.

HERBERICH, E.; SIKORSKI, J.; HOTHORN T. A robust procedure for comparing multiple means under heteroscedasticity in unbalanced designs. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9788, 2010.

HOELKER, M.; KASSENS, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD-HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 97, p. 41–49, 2017.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium

supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

INABA, Y.; MIYASHITA, S.; SOMFAI, T.; GESHI, M.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; NAGAI, T. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 86-92, 2016.

KASSENS, A.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TEFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. **Biology of reproduction**, v. 92, n. 6, p. 150, 2015.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847–856, 2000.

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

LEME, L. O.; CARVALHO, J. O.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 141, n. 1, p. 219–227, 2020.

LEME, L. O.; MACHADO, G. M.; FIDELIS, A. A. G.; GUIMARÃES, A. L. S.; SPRÍCIGO, J. F. W.; CARVALHO, J. O.; PIVATO, I.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Transcriptome of D14 in vivo x in vitro bovine embryos: is there any difference? **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 57, n. 6, p. 598–609, 2021.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 2006.

LONERGAN, P.; PEDERSEN, H. G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P. D.; FAIR, T.; EVANS, A.; BOLAND, M. P. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1096–1100, 2004.

LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; BLOCK, J.; FEAR, J. M.; BONILLA, A. Q.; HANSEN, P. J. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine embryos produced in vitro. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 5046-5054, 2009.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A. R.; PIVATO, I.; FIDELIS, A.; SPRICIGO, J. F.; PAULINI, F.; LUCCI, C. M.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 11, p. 936–947, 2013.

MARQUES, T. C.; DA SILVA SANTOS, E. C.; DIESEL, T. O.; LEME, L. O.; MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; DE OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD 2 and HSPB 1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 226–236, 2018.

MARQUES, T. C.; SANTOS, E. C. da S.; DIESEL, T. O.; MARTINS, C. F.; CUMPA, H. C. B.; LEME, L. de O.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; OLIVEIRA, E. B. de; GAMBARINI, M. L. Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134–141, 2021.

MENDONÇA, A. D. S.; SILVEIRA, M. M.; RIOS, Á. F. L.; MANGIAVACCHI, P. M.; CAETANO, A. R.; DODE, M. A. N.; FRANCO, M. M. DNA methylation and functional characterization of the XIST gene during in vitro early embryo development in cattle. **Epigenetics**, v. 14, n. 6, p. 568–588, 2019.

MENDONÇA, A. D. S.; GUIMARÃES, A. L. S.; FIDELIS, A. A. G.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. The use of insulin-transferrin-selenium (ITS), and folic acid on individual in vitro embryo culture systems in cattle. **Theriogenology**, v. 184, p. 153–161, 2022.

MUNDIM, T. C. D.; RAMOS, A. F.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; MELO, E. O.; GOMES, L. F. S.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1398–1407, 2009.

NOGUCHI, T.; AIZAWA, T.; MUNAKATA, Y.; IWATA, H. Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 1, p. 35–39, 2020.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RUAS, F. L.; SPRICIGO, J. F. W.; BASTOS, M. R.; DUARTE, L. M.; VELOZO, T.; DODE, M. A. N.; PUGLIESI, G.; DE OLIVEIRA CARVALHO, J. Embryo recovery rate in oviduct 2.5 days after IFIOT performed with different amounts of CCOs. **Animal Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 0–0, 2022.

SIMÕES, L. M. S.; SANTOS, A. P. C.; BOTTINO, M. P.; LIMA, E. A.; FERNANDES, U. R.; ORLANDI, R. E.; RODRIGUES, S. A. D.; CAIXETA, F. M.; ALVES, N. G.; SOUZA, J. C.; QUINTÃO, C. C. R.; CAMARGO, L. S. A.; DODE, M. A. N.; SALES, J. N. S. Nuclear maturation kinetics and in vitro fertilization of immature bovine oocytes injected into pre-ovulatory follicles. **Theriogenology**, v. 166, p. 90–96, 2021.

SPRÍCIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. de A. D.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. L.; CAIXETA, F. M. C.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 2054–2062, 2016.

STOECKLEIN, K. S.; GARCIA-GUERRA, A.; DURAN, B. J.; PRATHER, R. S.; ORTEGA, M. S. Actions of FGF2, LIF, and IGF1 on bovine embryo survival and conceptus elongation following slow-rate freezing. **Frontiers in Animal Science**, v. 3, p. 1040064, 2022.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129–1141, 2014.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P. J.; YANG, X.; GODKE, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, n. 3, p. 338–344, 1995.