

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CAMPUS URUGUAIANA

**EFEITO DA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR E DA eCG
PRÉVIO A OPU NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS BRAFORD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FELIPE GUSTAVO GARCIA

Uruguaiana – RS

2022

FELIPE GUSTAVO GARCIA

**EFEITO DA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR E DA eCG
PRÉVIO A OPU NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS BRAFORD**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janislene Mach Trentin

Uruguaiana – RS

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G216e Garcia, Felipe Gustavo

Efeito da sincronização da onda folicular e da eCG prévio a
opu na maturação de oócitos e na produção in vitro de embriões
em vacas braford / Felipe Gustavo Garcia.

52 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2022.

"Orientação: Fabio Gallas Leivas".

1. PIVE. 2. Bos taurus. 3. Onda folicular. 4. OPU. 5.
Blastocistos. I. Título.

FELIPE GUSTAVO GARCIA

**EFEITO DA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR E DA eCG
PRÉVIO A OPU NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS BRAFORD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade
Federal do
Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em
Ciência Animal

Dissertação defendida e aprovada 14 de setembro de 2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas
Orientador

Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Janislene Mach Trentin
Coorientadora

Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof. Dr. Gilson Antônio Pessoa

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Prof. Dr. Mateus José Sudano

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar



Assinado eletronicamente por **FABIO GALLAS LEIVAS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/10/2022, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Mateus José Sudano, Usuário Externo**, em 04/10/2022, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Janislene Mach Trentin, Usuário Externo**, em 04/10/2022, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **GILSON ANTONIO PESSOA, Usuário Externo**, em 10/10/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0937716** e o código CRC **D52C5417**.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Universidade Federal do Pampa

EFEITO DA SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR E DA eCG PRÉVIA A OPU NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS BRAFORD

AUTOR: Felipe Gustavo Garcia

ORIENTADOR: Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiana – RS, 14 de setembro de 2022.

O objetivo dessa dissertação foi avaliar o efeito da sincronização da onda folicular e da eCG prévia a OPU de doadoras Braford sobre a aquisição de competência oocitária, a taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar, reorganização mitocondrial e a taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. Fêmeas não gestantes e não lactantes com 48 meses ou mais de raça Braford foram submetidas à três seções de aspiração folicular em intervalos de 14 dias em um modelo experimental de crossover. Para avaliar o efeito da dose de eCG as doadoras foram divididas em três grupos: nenhum tratamento prévio a OPU (Controle), sincronização da onda folicular por meio farmacológico (Synchro) e sincronização da onda folicular mais 800 UI de eCG (eCG800). As doadoras dos grupos tratados receberam no dia 0 (D0) a administração via intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol, 5 mg de dinoprost trometamina e um dispositivo impregnado com 1g de progesterona (P4) foi inserido via intravaginal. No dia 3 (D3), nas doadoras do grupo eCG800 administraram-se 800 UI de eCG IM. No dia 6 (D6), o dispositivo de P4 foi removido e realizada a aspiração folicular de todas as doadoras. O número de folículos por doadora foi contado e classificado por tamanho. Avaliou-se então o número de folículos aspirados, número de oócitos obtidos, bem como os oócitos viáveis que foram avaliados quanto ao desenvolvimento de competência, maturação nuclear e citoplasmática por grupo no

experimento 1. No experimento 2, os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Toda a análise foi realizada por ANOVA, as diferenças comparadas pelo teste de Tukey com significância $P \leq 0,05$ e foi considerado tendência se $P > 0,05$ e $\leq 0,10$. Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Dunn. A quantidade de folículos médios no momento da OPU do grupo eCG800 foi superior aos demais ($P < 0,0001$ e $P = 0,004$) no experimento 1 e 2 respectivamente. A taxa de blastocisto no D7 no grupo eCG800 e Synchro apresentou tendência ($P = 0,075$) de superioridade. As demais variáveis (número de folículos pequenos, grandes e totais no momento da OPU, número de folículos aspirados, oócitos viáveis, blastocistos no D7 e blastocistos grau I por doadora por OPU, taxas de recuperação, de viabilidade, de competência oocitária, de extrusão do primeiro corpúsculo polar, de reorganização mitocondrial, de extrusão do primeiro corpúsculo polar combinada com a reorganização mitocondrial, de clivagem e de embriões de excelente qualidade) não apresentaram diferença estatística. Baseado nos resultados apresentados, conclui-se que a dose de 800 UI de eCG aumentou a proporção de folículos médios em relação ao grupo controle e junto com o grupo Synchro apresentaram tendência de aumentar a taxa de blastocistos no D7.

Palavras-chave: PIVE, *Bos taurus*, onda folicular, OPU, blastocistos.

ABSTRACT

Dissertation of master's degree

Program of Post-Graduation in Animal Science

Federal University of Pampa

EFFECT OF FOLLICULAR WAVE SYNCHRONIZATION AND eCG PRIOR OVUM PICK-UP ON OOCYTE MATURATION AND *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION IN BRAFORD COWS

AUTHOR: Felipe Gustavo Garcia

ADVISOR: Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiiana, September 14th, 2022

The objective of this dissertation was to evaluate the effect of follicular wave synchronization and eCG prior to OPU in Braford donors on the acquisition of oocyte competence, the rate of extrusion of first polar body and mitochondrial reorganization, and *in vitro* produced blastocysts. 48 months old or more non-lactating and non-gestating Braford females were submitted to three sessions of follicular aspiration at 14-day intervals on a crossover experimental design. To evaluate the effect of the eCG dose, donors were divided into three groups: no treatment prior to OPU (Control), follicular wave synchronization (Synchro), and follicular wave synchronization plus 800 IU of eCG (eCG800). On day 0 (D0), the donors received intramuscular (IM) administration of 2 mg of estradiol benzoate, 5 mg of dinoprost tromethamine and a device impregnated with 1 g of progesterone (P4) was inserted intravaginally. On day 3 (D3), the eCG800 group donors received 800 IU of eCG IM. On day 6 (D6), the P4 device was removed, and follicular aspiration of all donors was performed. The number of follicles per donor was counted and classified by size. The evaluation in experiment 1 was the number of aspirated follicles, the number of oocytes obtained, as well as the viable oocytes that were evaluated for competence development, nuclear, and cytoplasmic maturation per group.

In experiment 2, oocytes were matured, fertilized, and cultured *in vitro* to blastocyst stage. All analysis was performed by ANOVA, and the differences were compared by Tukey's test with significance $P \leq 0.05$ and tendency if $P > 0.05$ and ≤ 0.10 . Nonparametric data were evaluated by Dunn's test. The number of medium sized follicles at the time of OPU of the eCG800 group was higher than other treatments ($P < 0.0001$ and $P = 0.004$) in experiment 1 and 2, respectively. The blastocyst rate on D7 of eCG800 and Synchro group demonstrated superiority tendency ($P = 0.075$). The other variables (number of small, large, and total follicles at the time of OPU, number of aspirated follicles, oocytes, viable oocytes, blastocysts on D7 and excellent quality embryo per donor per OPU, rates of recovery, viability, oocyte competence, extrusion of first polar body, mitochondrial reorganization, extrusion of first polar body combined with mitochondrial reorganization cleavage and excellent quality embryo) showed no statistical difference. Based on presented results, it is concluded that the dose of 800 IU of eCG increased the proportion of medium follicles in relation to the control group, and among Synchro group tended to produce more blastocysts on D7.

Keywords: IVEP, *Bos taurus*, follicular wave, OPU, blastocysts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliações de maturação e competência oocitária.....	24
Figure 1. Experimental design.....	31
Figure 2. Donor hormonal protocol.....	31
Figure 3. Dispersion of the quantity of all sizes follicles visualized at OPU moment in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800) in both experiments.....	38
Figure 4. Evaluation of cleavage rate (cleaved structures / total COCs; $P = 0.249$) and blastocyst rate (blastocysts on day 7 / total COCs; $P = 0.075$) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Standard error of mean (SEM) was used to describe all the response variables.....	40

LISTA DE TABELAS

Table 1: Proportion of small (< 6 mm) medium (6 – 10 mm) and large (> 10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800).	36
Table 2: Results (mean ± SEM) of ovum pick-up (OPU), evaluation of oocyte competence (BCB) and oocyte maturation in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Means ± standard error of mean (SEM) were used to describe all the response variables.	37
Table 3: Proportion of small (< 6 mm) medium (6 – 10 mm) and large (> 10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800).	38
Table 4: Results (mean ± SEM) of ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (control, Synchro and eCG800).	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACB / BCB: Azul de cresil brilhante (*brilliant cresyl blue*)
- BE: Benzoato de estradiol
- CCOs / COCs: Complexos *cumulus* oócito (*cumulus-oophorus complexes*)
- CE: Cipionato de estradiol
- CIV: Cultivo *in vitro*
- CFA: Contagem de folículos antrais
- CL: Corpo lúteo
- D0: Dia 0
- D3: Dia 3
- D6: Dia 6
- D7: Dia 7
- DT: Transferência direta (*direct transfer*)
- eCG: Gonadotrofina coriônica equina (*equine chorionic gonadotrophin*)
- FIV: Fertilização *in vitro*
- FSH: Hormônio folículo estimulante (*follicle stimulant hormone*)
- G6PDH: Glicose-6-fostado desidrogenase
- GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas (*gonadotropin releasing hormone*)
- ha: Hectares
- hCG: Gonadotrofina coriônica humana (*human chorionic gonadotrophin*)
- IA: Inseminação artificial
- IATF: Inseminação artificial em tempo fixo
- IETS: Sociedade internacional de tecnologia de embriões (*International Embryo Technology Society*)
- IM: Intramuscular
- LH: Hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*)
- MHz: Mega Hertz
- MIV: Maturação *in vitro*
- OPU: Aspiração folicular (*ovum pick-up*)
- P4: Progesterona
- PGF2 α : Prostaglandina F-2-alfa
- PIB: Produto interno bruto

PIVE: Produção *in vitro* de embriões

SOV: Superovulação

TE: Transferência de embriões

UI: Unidades internacionais

VG: Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Protocolos para sincronização da onda folicular	19
2.2	Gonadotrofina Coriônica Equina	20
2.3	Desenvolvimento folicular	21
2.4	Competência oocitária	22
2.5	Maturação oocitária	23
3.	HIPÓTESE	25
4.	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo geral	25
4.2	Objetivos específicos	25
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	26
1.	Introduction	29
2.	Materials and methods	30
2.1	Experiment 1 – evaluation of oocyte competence and maturation	30
2.2	Experiment 2 – evaluation of blastocyst rate	30
2.3	Donor hormonal protocol	31
2.4	Ovum pick-up	32
2.5	Oocyte selection	32
2.6	Evaluation of oocyte competence development	33
2.7	In vitro maturation (IVM)	33
2.8	Oocyte denudation	33
2.9	Evaluation of mitochondrial reorganization	34
2.10	Evaluation of extrusion of first polar body	34

2.11	In vitro fertilization (IVF)	34
2.12	In vitro culture (IVC)	35
2.13	Cleavage and blastocyst rate	35
2.14	Statistical analysis	35
3.	Results	36
3.1	Experiment 1	36
3.2	Experiment 2	37
4.	Discussion	40
5.	Conclusion	42
	Acknowledgements	42
	Funding	43
	Declaration of Competing Interest	43
	References	43
6.	CONCLUSÃO	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais pilares da sustentação da economia brasileira é o agronegócio que em 2020 representou 27,5% do produto interno bruto (PIB) sendo a pecuária responsável por 10,5% do valor nacional. Detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, em 2021 o Brasil possuía 196,47 milhões de animais, dispostos em 163,1 milhões de hectares (ha) de pastagens (1,2 animais/ha) (ABIEC, 2022). O país também foi o segundo maior produtor de carne bovina, responsável por 14,3% da produção global (aproximadamente 10,3 milhões de toneladas), atrás apenas dos Estados Unidos da América. Entretanto, quando se trata de exportação de carne bovina, o Brasil foi o maior exportador com 2,69 milhões de toneladas, ultrapassando a Austrália e atingindo o maior faturamento com as vendas, próximo a US\$7,4 bilhões em 2020 (STATISTA, 2021; WORKMAN, 2021).

A OPU é uma técnica que pode ser realizada em diferentes fases do ciclo estral ou com a onda de crescimento folicular sincronizada (FERRÉ, et al., 2020) em fêmeas pré púberes, púberes, lactantes, não lactantes, não gestantes e gestantes até aproximadamente 4 meses de gestação (SENEDA et al., 2005) ou superior caso o técnico alcance seguramente os ovários. A técnica pode ser realizada semanalmente (CHAUBAL et al., 2007) o que intensifica a produção pecuária e reduz o intervalo de gerações, um fator importante no melhoramento genético (PELLEGRINO et al., 2016).

Segundo a *International Embryo Technology Society* (IETS) o número de embriões produzidos *in vitro* cresceu mais de 600% em um período de 18 anos no mundo, partindo de 160.700 em 2002 para 1.156.422 em 2020, ultrapassando pela primeira vez o volume de embriões produzidos *in vivo* em 2016. Durante o ano de 2020 foram produzidos 1.518.150 embriões no mundo, sendo 76,2% *in vitro*. Em vacas taurinas e zebuínas de corte 26.865 procedimentos foram realizados resultando uma média de 6,64 embriões produzidos *in vivo* por coleta via lavagem uterina. Quando comparado com embriões produzidos *in vitro* no mesmo ano, 85.261 doadoras de raça com aptidão de corte foram submetidas à OPU resultando em 546.811 embriões, média de 6,41 por animal (VIANA, 2021).

O Brasil foi o segundo país que mais utilizou a PIVE no mundo em 2020 com 32,33% dos embriões produzidos (VIANA, 2021). Isso deve-se ao fato de que a maioria do rebanho é *Bos taurus indicus* e estes animais obtêm ótimos resultados na OPU, por terem maior contagem de folículos antrais (CFA) (SOUZA et al., 2019) e um número

maior de folículos recrutados por onda resultando em mais complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) por aspiração (BARUSELLI et al., 2012; PONTES et al., 2009; WATANABE et al., 2017). Por outro lado, fêmeas de origem *Bos taurus taurus* apresentam menor quantidade de folículos médios (5-6mm) no momento da OPU (MERTON et al., 2003), implicando em menores taxas de sucesso da técnica. Atualmente busca-se melhorar a eficiência da técnica viabilizando sua aplicação em grande escala incluindo as taurinas.

O resultado da associação OPU/PIVE depende de vários fatores, entre eles a quantidade e qualidade dos CCO aspirados. Esses resultados são impactados por características fisiológicas individuais, como raça, escore de condição corporal, categoria animal e fase do ciclo estral. Estudos indicam que oócitos oriundos de folículos médios (6 a 10 mm) apresentam melhor viabilidade durante a PIVE e que a competência do oócito está diretamente associada ao diâmetro folicular (LONERGAN et al., 1994; SARWAR et al., 2020a; SENEDA et al., 2001).

Protocolos de sincronização da onda folicular com ou sem a aplicação de gonadotrofinas para obter folículos de tamanhos ideais antes da aspiração folicular podem ser boas opções para otimizar a técnica em determinadas situações (SARWAR et al., 2020b; SENEDA et al., 2020). Na América do Sul o protocolo tem sido utilizado com segurança e eficiência em animais *Bos taurus taurus* e se baseia na aplicação intramuscular de uma fonte de estrógeno para a supressão da liberação de hormônio folículo estimulante (FSH - *follicle stimulating hormone*) e indução da atresia folicular junto com a introdução de um dispositivo vaginal impregnado com progesterona (BÓ et al., 2019).

Com o compromisso de cunho social e sustentabilidade ecológica de melhorar a produtividade diminuindo a área utilizada e aumentar a produção, exportação e faturamento com a carne, as biotécnicas reprodutivas têm sido cada vez mais implementadas no cenário da pecuária nacional. A OPU/PIVE é uma técnica bem estabelecida e utilizada em larga escala em animais *Bos taurus indicus* no Brasil para se obter um maior número de produtos nascidos por ano de fêmeas selecionadas.

Em fêmeas *B. taurus* alguns animais apresentam um baixo número de folículos disponíveis para a OPU, enquanto outros apresentam uma baixa taxa de conversão de oócitos em embriões. Assim, uma estimulação prévia à aspiração pode levar a um crescimento folicular que resulte em melhores resultados viabilizando a técnica nessa subespécie e resultando em melhoramento genético acelerado dos rebanhos. Com isso, o

objetivo desse estudo foi avaliar a resposta ovariana, a qualidade dos oócitos e o desenvolvimento embrionário de oócitos obtidos de fêmeas bovinas Braford (3/8 *Bos indicus* e 5/8 *Bos taurus*) submetidas a sincronização da onda folicular ou sincronização da onda folicular associado a eCG prévia a OPU.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Protocolos para sincronização da onda folicular

Para se obter melhores resultados na produção *in vitro* de embriões, além dos ajustes em protocolos laboratoriais possíveis existem alguns ajustes que podem ser feitos para a otimização dos programas de OPU, como a seleção de doadoras pela contagem de folículos antrais, sincronização do ciclo estral, da onda folicular e estimulação hormonal exógena (MOROTTI et al., 2020; SENEDA et al., 2020).

O protocolo para sincronização da onda folicular usual consiste na administração de benzoato de estradiol (BE) ou hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH – *gonadotropin releasing hormone*) no dia 0, associado à uma fonte de progesterona (P4) (SÁ FILHO et al., 2011), seja via intramuscular de longa ação ou pelo dispositivo intravaginal por 5 a 7 dias (CEREZETTI et al., 2019; MOROTTI et al., 2013). Com esse tratamento a emergência da onda folicular acontece em 2 a 4 dias, e disponibiliza folículos homogêneos para serem aspirados. O uso de prostaglandina F-2-alfa (PGF2 α) também no início do protocolo é devido ao seu poder luteolítico. A presença do corpo lúteo (CL) exige mais cuidado do técnico na aspiração, pois pode dificultar o acesso aos folículos e causar sangramentos caso for perfurado (SENEDA et al., 2020).

O uso de protocolo de sincronização da onda folicular prévia à OPU em fêmeas da raça Nelore resulta em melhor taxa de conversão de embriões transferíveis e de concepção quando comparado com grupo controle, sem sincronização (CAVALIERI et al., 2018). Garcia et al. (2020) do mesmo grupo de pesquisa mostraram uma correlação positiva entre doadoras com a onda folicular sincronizada e maior CFA resultando em melhor taxa de prenhez em doadoras *B. indicus*, levando à uma melhora na eficiência do programa de PIVE.

Protocolos de superestimulação ovariana com gonadotrofinas, FSH e gonadotrofina coriônica equina (eCG - *equine chorionic gonadotropin*) prévia a OPU aumentam a disponibilidade de folículos para aspiração (BLODIN et al., 2002; BÓ et al., 2019; GOODHANG et al., 2000; RIBAS et al., 2018; SENDAG et al., 2008) e quantidade de oócitos viáveis por aspiração (ONGARATTO et al., 2020). Além disso, sabe-se que a utilização de FSH prévia a OPU é eficiente (EGASHIRA et al., 2019; ELLIFF et al.,

2019; ONGARATTO et al., 2015; SARWAR et al., 2020b; SENDAG et al., 2008; Da SILVA et al., 2017). No entanto, quando comparado à eCG, o custo do FSH se torna alto e devido sua meia vida curta, a administração ocorre em sucessivas aplicações, aumentando o número de manejos.

2.2 Gonadotrofina Coriônica Equina

A gonadotrofina coriônica equina é uma glicoproteína composta de duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos) produzida principalmente entre o 55º e 70º dia de gestação pelos cálices endometriais de égua prenhe, porém a produção se inicia aos 40 dias e se estende até os 140 dias de gestação, momento em que as células são direcionadas para destruição por uma resposta imune celular materna (ALLEN e STEWART, 1993; HOPPEN, 1994). Vários fatores determinam a quantidade de eCG produzida, tais como o tamanho da égua, independentemente do tamanho do feto gestado (ALLEN et al., 2002), o número de partos, onde o pico de produção cai 38% durante a terceira e a quinta gestação, assim como éguas que praticam mais exercícios e são melhores condicionadas fisicamente produzem menos do que as que não (WILSHER e ALLEN, 2011). Existem várias indicações para o uso da eCG em bovinos, como a reversão do anestro, indução da puberdade, aumento da fertilidade, crescimento folicular (um ou vários folículos) e superovulação (MURPHY, 2012; De RENSIS e LOPEZ-GATIUS, 2014).

A eCG, é uma molécula capaz de estimular receptores de FSH e LH, com menor custo e que requer apenas uma aplicação por conta de sua longa meia vida (até 3 dias), no entanto apresenta resultados controversos que variam conforme a dosagem utilizada, 3000 UI (SENDAG et al., 2008), 2500 UI (VOS et al., 1999), 1600 UI (ALLER et al., 2012), 800 UI (ONGARATTO et al., 2015) e 400 UI (FERNANDES et al., 2021; GONÇALVES et al., 2017; MARTINS et al., 2012; REIS et al., 2010; SONNEWEND et al., 2016).

Recentemente um estudo utilizando doadoras *B. taurus* sintéticas da raça Braford sugeriu a utilização de 800 UI de eCG para estimulação ovariana, proporcionando um aumento na proporção de folículos médios e grandes (> 6 mm de diâmetro) no momento

da OPU, levando a melhor recuperação oocitária, maiores taxas de clivagem e menor índice de polispermia (RIBAS et al., 2018).

Além disso, gonadotrofinas têm um impacto positivo no desenvolvimento inicial do folículo antral, no fenótipo morfológico e molecular dos oócitos (FERNANDES et al., 2021), melhoram o desenvolvimento da competência oocitária, chegando no momento da aspiração folicular um maior número de oócitos em estágio de vesícula germinativa 2 (VG) e folículos de tamanho ideal (6 a 10 mm), resultando em taxas de blastocistos superiores a 37% (BLONDIN et al., 2012; SOARES et al., 2020a).

2.3 Desenvolvimento folicular

Oócitos oriundos de folículos antrais iniciais à médios têm quatro diferentes padrões de configuração de cromatina, sendo de VG0 a VG3. Oócitos em VG0 demonstram uma capacidade muito limitada de reiniciar meiose, enquanto os outros três estágios são capazes de atingir metáfase II *in vitro*, tornando a configuração de cromatina um marco para a competência e diferenciação oocitária (DEICI et al., 2016).

A dispersão do estágio de VG nos folículos é heterogênea (LODDE et al., 2007), variando até mesmo entre diferentes raças de bovinos, sendo que em dia aleatório do ciclo estral vacas da raça Holandesa tinham 19,9%, 47,44% e 17,44% dos oócitos em VG1, VG2 e VG3 respectivamente. Vacas da raça Nelore apresentavam 1,3% em VG1, 50,2% em VG2 e 39,66% em VG3 (SOARES et al., 2020b).

O tamanho folicular (2-4, 4-6 e > 6mm) não pode ser relacionado com a distribuição dos diferentes estágios de configuração de cromatina (DIECI et al., 2016). Se hipoteticamente implementar da técnica de sincronização da onda folicular pré-abate a taxa de 35% de oócitos em VG2 pode se elevar para até 75% (SIRARD, 2019).

Sabe-se que é durante o período de dominância folicular, após a diminuição de FSH e o pico de hormônio luteinizante (LH – *luteinizing hormone*) pré-ovulatório que o oócito adquire sua competência final (SIRARD et al., 2006), sendo protocolos que agem na secreção de GnRH permitiram o estudo do papel do LH no período da ovogênese (MACLELLAN et al., 1998).

A supressão dos níveis basais de LH durante o período final do ciclo estral reduz a qualidade dos oócitos. Enfatizando a importância do papel do LH na aquisição da competência oocitária e especialmente o impacto positivo possivelmente associado aos níveis basais de LH durante a fase de crescimento folicular (SIRARD, 2016).

Egashira et al., (2019) concluíram que o uso de oócitos que iniciaram a maturação *in vivo* melhorou a produção de embriões congeláveis e a taxa de prenhez. Chaubal et al., (2007) relataram maiores quantidades de folículos aspirados e maior produção de blastocistos ($P < 0,05$) em 8 dias de cultivo *in vitro* no grupo com a aplicação intramuscular de 1500UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) 6 horas antes da OPU comparado ao controle.

A vantagem do uso da eCG é o auxílio no crescimento folicular e possivelmente no início da maturação oocitária ainda *in vivo* com atividade análoga ao LH (BARUSELLI, et al., 2008; MURPHY, 2012).

2.4 Competência oocitária

Na busca de melhores resultados na PIVE, uma opção simples e eficaz para avaliar a competência oocitária após a seleção morfológica e antes da fase de maturação *in vitro* é pelo teste de azul de cresil brilhante (ACB; OPIELA et al., 2010) que detecta a atividade enzimática glicose-6-fostado desidrogenase (G6PDH), um marcador de competência oocitária .

A G6PDH é uma enzima sintetizada em oócitos em crescimento, porém com menor atividade em oócitos já crescidos (PUJOL et al., 2004). Já foi demonstrado que a detecção da atividade dessa enzima baseada na coloração de ACB pode ser uma boa prática para predizer o desenvolvimento da competência oocitária (ALM et al., 2005).

Oócitos oriundos de folículos maiores que 6 mm de diâmetro quando a doadora foi submetida à um tratamento de superestimulação ou quando a onda folicular foi sincronizada prévia a aspiração rendem oócitos mais competentes quando comparados à técnica realizada em dia aleatório do ciclo estral, a qual poderá apresentar folículo em dominância levando os demais a apresentarem algum sinal de atresia (HAGEMANN et al., 1999; NIVET et al., 2012).

Oócitos que se mantêm com citoplasma não corados (ACB -) indicam uma alta atividade da G6PDH, reduzindo o corante a um componente incolor. Por outro lado, oócitos que retêm o corante em seu citoplasma (ACB +) indicam uma baixa atividade enzimática e um fim de seu crescimento (BHOJWANI et al., 2007; ERICSSON et al., 1993; OPIELA; KATSKA-KSIAZKIEWICZ 2013) (Figura 1).

2.5 Maturação oocitária

Para o acontecimento da maturação oocitária e consequente aquisição de competência, mudanças nucleares ocorrem entre o estágio de VG e a metáfase II. O processo completo para se ter um oócito competente (aptidão para atingir o estágio de blastocisto depois de fertilizado) se inicia poucos dias antes da ovulação, envolvendo mudanças no ambiente folicular e na aquisição da habilidade de resumir a meiose e se tornar fértil (LUCIANO e SIRARD, 2018).

A maturação oocitária é acompanhada por maiores mudanças no ooplasma, as quais levam para a finalização de mudanças nucleares e citoplasmáticas (BREVINI et al., 2007). Durante a maturação, existem diferenças específicas nos padrões mitocondrial e de cromatina entre os oócitos com diferentes competências meióticas. A cinética das mudanças mitocondriais é influenciada não somente pela competência do oócito mas também pela qualidade (JESETA et al., 2014).

Dieci et al., (2016) mostraram que a ideia de sincronia entre eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares são ajustados durante a fase final do crescimento oocitário. Manter os oócitos em meio de cultivo com peptídeo natriurético C pré MIV com o objetivo de atrasar o resumo da meiose e prolongar a comunicação entre o oócito e as células do cumulus propuseram uma melhor coordenação dos eventos de maturação e melhores resultados (DIECI et al., 2016; FRANCIOSI et al., 2014; SOARES et al., 2020b).

A maturação nuclear é a capacidade de quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica, em seguida, a capacidade para progredir até metáfase I, e por fim adquirem habilidade para chegar à metáfase II e serem fertilizados (SÁNCHEZ e SMITZ, 2012). As mudanças nucleares, por exemplo o remodelamento da cromatina, que ocorrem entre o estágio de vesícula germinativa e metáfase II representam os últimos

passos do processo e são facilmente observadas por microscopia pós coloração do DNA com corantes fluorescentes (LUCIANO e SIRARD, 2018).

A primeira evidência de maturação citoplasmática ocorre quando o oócito interrompe sua fase de preparação (RNA e síntese proteica), modificando a maquinaria de tradução e transcrição (condensação de nucléolos e depleção de ribossomos). A segunda série de mudanças ocorre perto da onda de LH, que leva a uma redistribuição de organelas, como mitocôndrias e grânulos corticais, juntamente com as alterações que ocorrem com a retomada da meiose (HYTTEL et al., 1989) (Figura 1B).

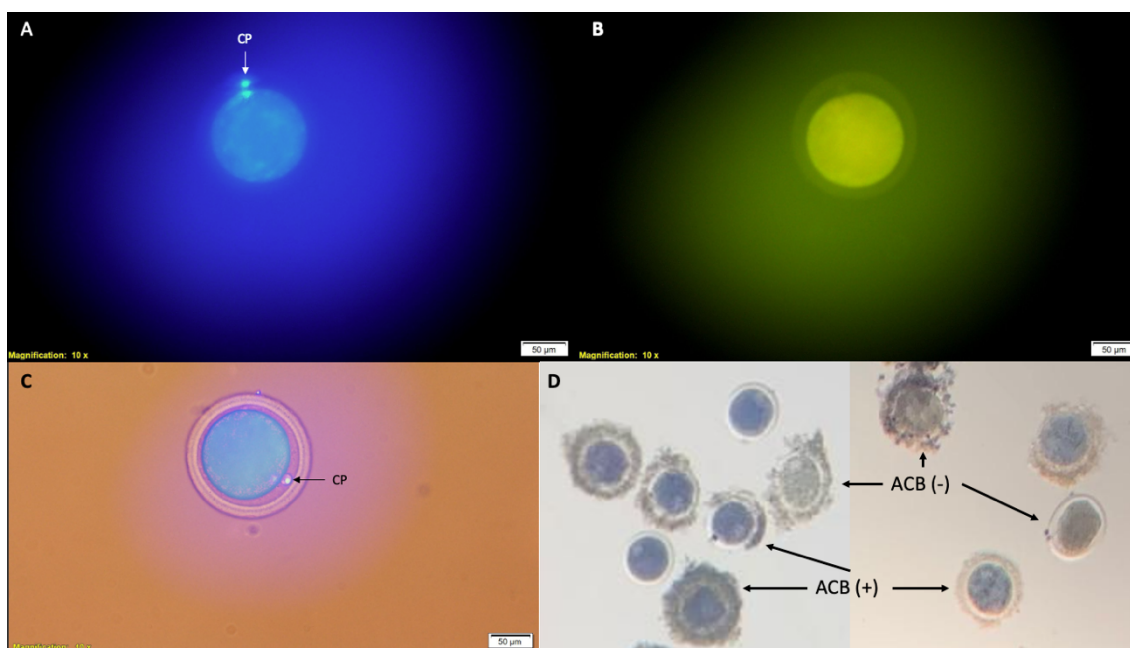


Figura 1. Avaliações de maturação e competência oocitária. A) Avaliação da maturação nuclear através da extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) pelo método de coloração de Hoechst 33342 – Sigma B2261. B) Avaliação da maturação citoplasmática através da reorganização mitocondrial pelo método de coloração de Mitotracker Green FM (MT Molecular Probes). C) Extrusão do primeiro corpúsculo polar com sobreposição de imagem corada com microscopia óptica. D) Avaliação da competência oocitária pelo método de coloração de Azul de Cresil Brillhante (ACB – Sigma B5388) (+) indicam corados/mais competentes e (-) indicam os não corados/menos competentes. Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a sincronização da onda folicular e a aplicação de 800 UI de eCG 72 horas antes da aspiração folicular somada ao protocolo de sincronização da onda folicular favorece a obtenção de oócitos de maior competência, que completam a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a reorganização mitocondrial além da produção *in vitro* de mais embriões de excelente qualidade de vacas Braford não lactantes e não gestantes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Monitorar o efeito da sincronização da onda folicular e da estimulação do crescimento folicular com eCG prévia a OPU comparadas à aspiração folicular em dia aleatório do ciclo estral (controle) sobre a quantidade e qualidade dos oócitos e embriões produzidos *in vitro* em fêmeas bovinas da raça Braford.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da sincronização da onda folicular e da estimulação de crescimento folicular com 800 UI de eCG prévio a OPU sobre:
 - O número e tamanho de folículos no momento da OPU
 - O número de CCOs coletados
 - A competência oocitária através da detecção da atividade da G6PDH
 - A taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar e reorganização mitocondrial
 - A taxa de blastocistos de produzidos *in vitro* e a qualidade embrionária

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As secções *Materiais e métodos*, *Discussão e Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que será apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico *Animal Reproduction Science*.

ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of prior follicular wave synchronization and eCG on ovum pick-up and *in vitro* embryo production in Braford donor cows

Felipe G. Garcia¹, Bento M. de Menezes Bisneto², Caroline F. Possebon¹, Rosana Klaus³, Marcelo S. Albornoz³, Daniela dos S. Brum¹, Janislene M. Trentin⁴, Fabio G. Leivas^{1*}

¹ Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab of Biotechnology of Reproduction, 97.500-870, Uruguaiana, RS, Brazil.

² Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), M.I.N.T., Lab of Molecular and Integrative Physiology of Reproduction, 97.500-870, Uruguaiana, RS, Brazil.

³ In Vitro Rio Grande do Sul, Santana do Livramento, RS, Brazil.

⁴ Universidade Federal do Paraná (UFPR) Setor Palotina, Animal Reproduction Lab, 85.950-000, Palotina, PR, Brazil

Corresponding author: Fabio Gallas Leivas, Rod. BR 472, Km 587, CP 118, 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brazil: fabioleivas@unipampa.edu.br, phone +555534134321.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of follicular wave synchronization and eCG prior to OPU in Braford donors on the acquisition of oocyte competence, the rate of oocyte maturation and *in vitro* produced blastocysts. Cows (n=27) were divided into three groups on a crossover model: no treatment prior to OPU (Control), follicular wave synchronization (Synchro), and synchronization plus 800IU of eCG (eCG800). Donors were synchronized with P4+EB+PGF_{2α} and on day 3, eCG800 group donors received 800IU of eCG. On day 6, OPU was performed. The number of follicles were counted and classified by size. The viable oocytes were evaluated for competence development, extrusion of first polar body, and mitochondrial reorganization per group. In experiment 2, oocytes were matured, fertilized, and cultured *in vitro* to blastocyst stage. All analysis was performed by ANOVA, and the differences were compared by Tukey's test with significance $P \leq 0.05$ and tendency if $P > 0.05$ and ≤ 0.10 . The number of medium sized follicles at the time of OPU of eCG800 group was higher for eCG800 ($P < 0.0001$ and $P = 0.004$) in experiment 1 and 2 respectively. Moreover, blastocyst rate on D7 showed tendency ($P = 0.075$) to improve from control (17%) to Synchro (23.8%) to eCG800 (37.3%). It was concluded that the dose of 800IU of eCG 72 hours prior OPU increased the proportion and number of medium follicles in relation to Control and Synchro group, tending to produce more blastocysts on D7.

Keywords: IVEP, *Bos taurus*, follicular wave, OPU, blastocysts.

1. Introduction

A critical factor that influences *in vitro* embryo production (IVEP) efficiency is the estrous cycle's phase that ovum pick-up (OPU) is performed (Bó et al., 2019). Most of the commercial programs were done on a random day of the cycle, with no control of the emergence of the follicular wave dynamics (Morotti et al., 2014; Pontes et al., 2011) and all visible follicles on ultrasound are punctured and aspirated.

A previous study has shown satisfactory results when OPU was performed three to four days after estrous (Pieterse et al., 1991). Updating to a new reality where synchronizing the follicular wave prior OPU is possible, it's been shown that it can improve results (Cavalieri et al., 2018; Nawaz, et al., 2022; Seneda et al., 2020), as well as using hormone therapies such as equine chorionic gonadotropin (eCG) with a safe dose of 800 IU to stimulate follicular growth, decrease polyspermy rate and improve cleavage rate (Ribas et al., 2018). This improvement happens because there is better oocyte quality due to the absence of atretic events (Bacelar et al., 2010), which on a random day of estrus cycle follicle aspiration, up to 85% of oocytes have some degree of atresia (Hendriksen et al., 2000).

OPU/IVEP is widely used, but blastocyst conversion rate reached a plateau of 30 to 40%, very similar to what was found in the 1990s (Seneda et al., 2020). In Brazil, it is mainly used on zebu cows without ovarian stimulation. On taurine influenced cattle, it is known that antral follicle count is low (Sartori and Barros, 2011) resulting on less potential for embryo production and fewer viable embryos (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007). The comprehension of response of taurine cows to stimulation and the effect of eCG treatment on oocyte maturation and embryonic development needs to be better elucidated as an alternative to improve embryo production results.

In this present study, it was hypothesized that synchronization of follicular wave and ovarian follicular stimulation protocol using 800 IU of eCG combined with follicular wave synchronization prior to OPU would favor obtaining more competent oocytes with complete maturation and production of greater quantity and quality of embryos from Braford (3/8 *Bos indicus* and 5/8 *Bos taurus*) donors. The objective was evaluated the effect of follicular wave synchronization and 800 IU of eCG prior to OPU in Braford cows over quantity and quality of oocytes and embryos produced *in vitro*.

2. Materials and methods

The experiments were carried out in two different commercial farms, in Uruguaiana (experiment 1) and Santana do Livramento (experiment 2) in the western border region of Rio Grande do Sul, Brazil. First experiment was between August and September of 2021 and the second was between April and May 2022. Braford non-lactating cows (n-15) 48 months old which were detected as non-pregnant at 2020/2021 breeding season (exp. 1) and (n-12) 48 months old or more which by the end of 2021/2022 breeding season were not pregnant and not lactating (exp. 2) were used as oocytes donors. All groups of animals stayed in a native vegetation (biome Pampa) of Rio Grande do Sul (RS) with ad libitum access to water and mineral supplementation, under the same feeding and management conditions. Their weight and body condition score (Maciel, 2006; Ayres, 2008) were evaluated throughout the experiment.

The experiment was submitted, approved, and performed in accordance with the National Council of Control in Animal Experimentation of Brazil (CONCEA, CEUA Unipampa), registered under protocol number 033/2021. Chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated; synchronization protocol hormones were obtained from Zoetis (São Paulo, SP, Brazil).

2.1 Experiment 1 – evaluation of oocyte competence and maturation

Fifteen non-lactating and non-pregnant Braford cows (primiparous) were randomly allocated into three groups according to treatments: Control Group: aspirated at random estrus day (n = 5); Synchro Group: with a pre-synchronized follicular wave (n = 5) and eCG800 Group: pre-synchronized follicular wave plus 800IU of eCG three days before OPU (n = 5). A crossover model was performed to reduce the influence of individual variation. Thus, all donors underwent the three treatments and follicular aspirations were performed at 14-day intervals (three repetitions). Evaluation of oocyte competence was done on the same day of OPU and maturation 24 hours later (Fig. 1).

2.2 Experiment 2 – evaluation of blastocyst rate

Other 12 non-lactating and non-pregnant Braford cows (multiparous) were randomly allocated into three groups identical to experiment 1 (Control, Synchro and

eCG800), however, oocytes aspirated were matured, fertilized and cultured for seven days to evaluate the blastocyst rate (Fig. 1).

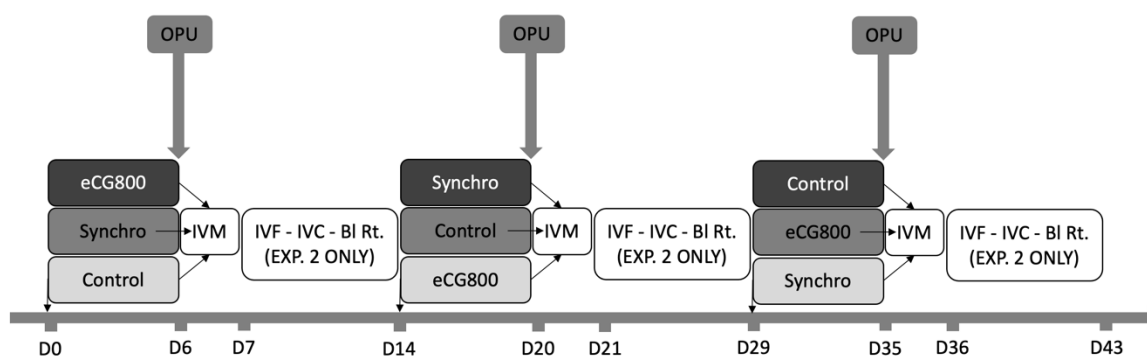


Figure 1. Experimental design. OPU: Ovum pick-up; IVM: In Vitro Maturation (for both experiments); IVF: In Vitro Fertilization; IVC: In Vitro Culture; BI Rt.: Blastocyst Rate (for experiment 2 only); Treatments: Control (cows submitted to OPU on random day of estrus cycle); Synchro: synchronized follicular wave prior OPU; eCG800: synchronized follicular wave plus 800 IU of eCG prior OPU.

2.3 Donor hormonal protocol

Non-pregnant and non-lactating Braford cows received on day 0 (D0) intramuscular (IM) 2 mg of estradiol benzoate (EB), prostaglandin F₂ α analogue (PGF₂ α) and a device impregnated with 1g of progesterone (P4) inserted vaginally. On day 3 (D3), donors of eCG800 group received 800 IU of eCG. On day 6 (D6), the P4 device was removed of groups Synchro and eCG800, and donors underwent follicular aspiration. The control group did not receive any synchronization nor stimulation (Fig. 2).

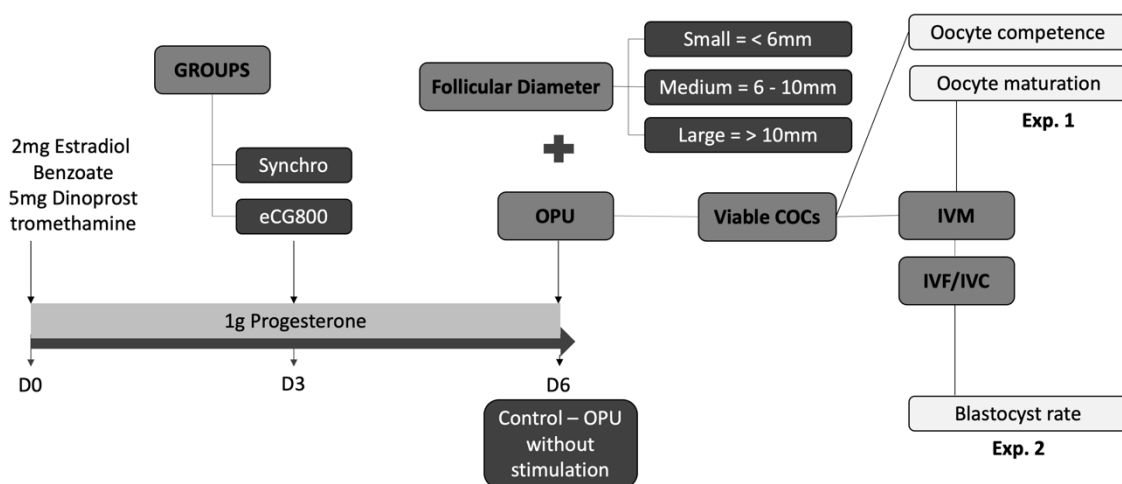


Figure 2. Donor hormonal protocol. Day 0: Control group did not receive any synchronization nor stimulation. Insertion of intravaginal device of 1g of progesterone, 2mg of estradiol benzoate IM and 25mg of dinoprost tromethamine IM; Day 3: Separation of donors into one of the treatment groups: eCG800 (800 IU of eCG IM) or Synchro (no eCG treatment); Day 6: Removal of the intravaginal device, evaluation and counting of follicular diameter, follicular aspiration, oocyte selection, evaluation of oocyte competence development, beginning of in vitro maturation and evaluation of in vitro maturation rate. On experiment 2, fertilization of oocytes, culture of probable zygotes and evaluation of cleavage and blastocyst rate.

2.4 Ovum pick-up

Before each OPU session, each female was walked to a specific bovine chute frequently used by them without any harming movements, making the procedure secure for both animal and researcher. Prior to follicle aspiration, each cow received caudal epidural anesthesia using 4 mL of 2% lidocaine. Feces were removed from the rectum and the perineal area was wiped with tap water and 70% ethanol. Immediately before OPU, each ovary was located by rectal palpation and examined by ultrasonography using a portable ultrasound machine (Mindray Z5, Shenzhen, China) with a 5 MHz convex transducer attached in a plastic/acrylic vaginal probe guide (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). All visible follicles were measured and classified according to the diameters (small: < 6 mm, medium: 6 to 10 mm, and large: > 10 mm, Machatkova et al., 2004). For OPU, a 20G aspiration needle (WTA, Cravinhos, SP, Brazil) was used which was connected to a conical tube (50 ml, Falcon, USA) via 1.20m silicone tubing (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). Aspiration was performed at a vacuum pressure of 110 mmHg, equivalent to a flow rate of 10 to 15 mL of H₂O/min, generated by a vacuum pump (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). DMPBS aspiration medium (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) was supplemented with heparin (5 IU/ml). The collection conical tube with the medium was placed in a tube heater (WTA, Cravinhos, SP, Brazil) at a temperature of 37.5°C during the procedure. Each tube was identified with the donor number in addition to the date and time of aspiration. Donors were aspirated on the same day by the same operator.

2.5 Oocyte selection

A field laboratory was set up attached to the farm's corral so that after each aspiration recovered follicular fluid was filtered (filter with 100-micron nylon mesh, WTA, Cravinhos, SP, Brazil), and subsequently washed in the same medium in that they were collected. *Cumulus-oophorus* complexes (COCs) were searched and selected under a stereomicroscope and were classified on the characteristics of the cumulus and ooplasm cells (Lonergan, 1992). Grades 1, 2, and 3 oocytes were taken for evaluation of competence development and subsequent *in vitro* maturation. The number of COCs collected per OPU and the number of viable COCs recovered per OPU were quantified for each treatment.

2.6 Evaluation of oocyte competence development

Immediately after collection, selection, and morphological classification, the oocytes were washed three times in drops of DMPBS with the addition of 0.4% bovine serum albumin and pyruvate (2 μ L/ml). Then, the COCs were exposed to 26 μ M of brilliant cresyl blue (BCB) diluted in DMPBS and incubated in an oocyte transporter (TO-16i, WTA, Cravinhos, SP, Brazil), in 1.5 ml microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 90 minutes at 37.5°C. Oocytes that remained blue were considered more competent than those which became colorless (Pujol et al., 2004).

2.7 *In vitro* maturation (IVM)

It began on the farm, for experiment 1 in an oocyte transporter (TO-16i, WTA, Cravinhos, SP, Brazil), organized in groups of COCs of the same treatment in 1.5 ml microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) in TCM 199 HEPES medium, then into well dishes (Nunc, Massachusetts, USA) at BIOTECH with TCM199 plus 10% estrous mare serum, 5 μ g/ml FSH, 50 μ g/ml LH, 22 μ g/ml of pyruvate and gentamicin. The maturation period was 21 to 24 hours in an incubator at 38.7°C, in a gaseous atmosphere with 5% CO₂ and saturated humidity. On experiment 2, oocytes of each donor were put into 5 ml glass test tubes with 300 microliters of maturation media (ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil), 200 microliters of mineral oil and a gaseous mixture of 90% N₂, 5% CO₂ and 5% O₂ and saturated humidity. They were transported to In Vitro Rio Grande do Sul in an oocyte transporter (TO-39 OLED, TED, Cravinhos, SP, Brazil). Oocytes remained in the same tubes, but they had their silicon lid switched on the moment they enter the incubator. Maturation period was approximately 24 hours in an incubator at 38.7°C, in a gaseous atmosphere with 5% CO₂ and saturated humidity.

2.8 Oocyte denudation

After the IVM period, oocytes (n-390) were washed in TCM 199 HEPES and incubated for 10 minutes in a solution of 1mg/ml of hyaluronidase in 400 μ l of TCM 199 HEPES at a temperature of 38.7°C. Then, the cumulus cells were mechanically denuded and washed in the same medium as before to have their maturation evaluated.

2.9 Evaluation of mitochondrial reorganization

Denuded oocytes (n=390) were incubated in the dark for 30 minutes at 38.7°C with Mitotracker Green FM (MT; Molecular Probes INC, USA) at a concentration of 250 nM in TCM 199 HEPES and were evaluated by using a fluorescence microscope with an excitation wavelength of 490 nm and emission 516 nm. For the evaluation of cytoplasmic maturation, the method of mitochondrial reorganization was used. Oocytes that showed homogeneous dispersion and/or staining intensity associated with the central location of mitochondria had an indication of complete cytoplasmic maturation. Oocytes with mitochondria in the peripheral region of the ooplasm and/or with the presence of vacuoles had an indication of incomplete cytoplasmic maturation (Stojkovic et al., 2001).

2.10 Evaluation of extrusion of first polar body

The same denuded oocytes (n=390) were co-incubated for 10 minutes, after 20 minutes in MT, in the dark with 10 µg/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33342 – Sigma B5388) at 38.7°C and evaluated using a fluorescence microscope with an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 410 nm. Oocytes were individually evaluated in 3µl drops of TCM 199 HEPES. Those with extrusion of the first polar body were considered completed nuclear maturation, and without this extrusion were considered immature.

2.11 *In vitro* fertilization (IVF)

Semen straws of the same Braford bull with proven fertility were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds and homogenized. Subsequently, the semen was subjected to the Washing selecting method (Sanches et al., 2016). It was added 800 microliters of TL Semen media (ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil) plus semen. This mixture was subsequently centrifuged for five minutes at 53 x g. The pellet was resuspended in 800 microliters of IVF media (ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil) and recentrifuged again for five minutes at 53 x g. Then 120 µL pellet, resulting from the second centrifugation, was put in a 0.5 ml eppendorf and used five microliters for each drop for IVF. The sperm cells and oocytes co-culture was performed for 24 h at 38.7 °C with saturated humidity and gaseous atmosphere of 5% CO₂.

2.12 *In vitro* culture (IVC)

After 24 hours of co-culture, the probable zygotes were denuded by pipetting and washed in 100 microliters TL-semen wash media, then 50 microliters TL-semen plus 50 microliters SOF1 (ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil), then 100 microliters SOF1. Probable zygotes were transferred and allocated in 100µl drops of SOF1 medium under mineral oil and kept for total seven days in an incubator at 38,7°C, 5% CO₂, 90% N₂ and 5% O₂. Non-cleaved structures were removed and 50% of medium was switched for the same SOF1 media on day 3. Two days later (D5), 50% of medium was switched again for SOF 2 (ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil) and kept for two more days to complete seven days of culture.

2.13 Cleavage and blastocyst rate

The number of cells at 72 hours post insemination (HPI) was evaluated. Structures with two or more cells were considered cleaved.

Seven days after IVF, or 168hpi, structures were evaluated regarding quantity and quality according to International Embryo Technology Society (IETS) of initial blastocysts (Bi/5), blastocysts (Bl/6) and expanded blastocysts (Bx/7), hatching blastocysts (Bn/8). Grades 1, 2, and 3 were counted for this variable.

Seven days after IVF as well, only excellent quality embryos (grade 1) according to IETS went through slow cryopreservation method (Sanches et al., 2016), also known as Direct Transfer (DT).

2.14 Statistical analysis

Normality tests were analyzed with Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov. On data considered parametric, it was performed ANOVA and the differences were compared by Tukey's test. Variables that were considered nonparametric (medium and large follicles visualized on OPU, number of viable oocytes/donor/session and % of BCB – oocytes, limited to experiment one) went through Kruskal-Wallis test and a Chi-Square test was performed, and the differences were compared by Dunn's test. Statistical Analysis System for Windows 9.0 (SAS 9.0, 2002) was used to verify statistical differences. The individual effect of the donor was included as a random effect. Means ±

standard error of mean (SEM) were used to describe all the response variables. Significance was set at $P \leq 0.05$ and tendencies were determined if $P > 0.05$ and ≤ 0.10 .

3. Results

3.1 Experiment 1

The number of all sizes of follicles visualized (fig. 3) was similar between the treatments ($P = 0.767$). Only the medium sized follicles (6 – 10 mm) differed among the treatments ($P < 0.0001$). Proportionally eCG800 was significantly higher ($64^b \pm 0.79$) than control ($8^a \pm 0.16$) and Synchro ($8^a \pm 0.21$). Small ($< 6\text{mm}$) and large ($> 10\text{mm}$) sizes follicles were similar, ($P = 0.563$) and ($P = 0.348$) respectively (Table 1).

Table 1: Proportion of small (< 6 mm) medium (6 – 10 mm) and large (> 10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Different letters (^a and ^b) mean significance. Means \pm standard error of mean (SEM) were used to describe all the response variables.

	Control	Synchro	eCG800	<i>P-value</i>
No. OPU Sessions	15	15	15	
Small Follicles Visualized	n=385 \pm 4.13 96.98%	n=336 \pm 3.73 96.55%	n=298 \pm 3.55 75.25%	0.5635
Medium Follicle Visualized	n=8 ^a \pm 0.16 2.01%	n=8 ^a \pm 0.21 2.3%	n=64 ^b \pm 0.79 16.16%	< 0.0001
Large Follicles Visualized	n=4 \pm 0.12 1.01%	n=4 \pm 0.21 1.15%	n=34 \pm 1.13 8.59%	0.3485
All Sizes Follicles Visualized	n=397 \pm 4.06 100%	n=348 \pm 3.69 100%	n=396 \pm 3.03 100%	0.7679

The number of aspirated follicles per donor per session was similar when comparing the three treatments ($P = 0.765$). As well as number of COC / donor / session ($P = 0.921$). Recovery rate ($P = 0.386$) and viable oocyte rate ($P = 0.910$) were alike, in tandem with the number of viable COC per donor per session ($P = 0.908$).

Regarding oocyte competence using BCB staining, there was no difference found on BCB + ($P = 0.724$) nor BCB – ($P = 0.653$). In respect to oocyte maturation, there were no significant differences. For extrusion of first polar body (nuclear maturation; $P = 0.905$). These results go in conjunction with mitochondrial reorganization (cytoplasmatic maturation; $P = 0.342$). Furthermore, when summed oocytes that underwent nuclear and

cytoplasmatic maturation, we have similarity among the treatments to oocytes that had extrusion of first polar body combined with mitochondrial reorganization ($P = 0.781$) (Table 2).

Table 2: Results (mean \pm SEM) of ovum pick-up (OPU), evaluation of oocyte competence (BCB) and oocyte maturation in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Means \pm standard error of mean (SEM) were used to describe all the response variables.

	Control	Synchro	eCG800	<i>P-value</i>
No. aspirated follicles / donor / session	22.8 \pm 3.19	20.13 \pm 3.21	22.8 \pm 2.45	0.7658
No. COC / donor / session	12.4 \pm 2.63	12.53 \pm 2.22	13.67 \pm 2.44	0.9218
Recovery rate (COCs / aspirated follicles), %	54.38 \pm 4.47 86/342	62.25 \pm 5.36 188/302	59.94 \pm 6.03 205/342	0.3864
Viable oocyte rate, %	75.27 \pm 4.28 140/186	79.26 \pm 3.58 149/188	74.63 \pm 3.82 153/205	0.9101
No. viable COCs / donor / session	9.33 \pm 2.32	9.93 \pm 2.28	10.2 \pm 2.19	0.9086
BCB - oocytes, %	25 \pm 4.63 34/136	16.91 \pm 1.76 23/136	12.08 \pm 1.52 18/149	0.6535
BCB + oocytes, %	75 \pm 3.51 102/136	83.09 \pm 10.9 113/136	87.92 \pm 13.12 131/149	0.7244
Extrusion of 1st polar body, %	33.33 \pm 3.83 43/129	40 \pm 4.37 50/125	33.08 \pm 3.51 45/136	0.9054
Mitochondrial reorganization, %	59.68 \pm 6.88 77/129	52.8 \pm 7.02 66/125	49.26 \pm 9.26 67/136	0.3424
Extrusion of 1st PB among mitochondrial reorganization, %	24.03 \pm 2.60 31/129	26.4 \pm 4.72 33/125	16.91 \pm 2.66 23/136	0.7810

3.2 Experiment 2

The number of all sizes of follicles visualized (fig. 3) was similar between the treatments ($P = 0.987$). Only the medium sized follicles (6 – 10 mm) differed among the treatments ($P = 0.004$). Proportionally eCG800 was significantly higher than Synchro, but control was in the middle and considered similar to both treatments cited before. Small

(< 6mm) and large (> 10mm) sizes follicles were alike, ($P = 0.827$) and ($P = 0.333$) respectively (Table 3).

Table 3: Proportion of small (< 6 mm) medium (6 – 10 mm) and large (> 10 mm) follicles visualized before ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Different letters (^a and ^b) mean significance. Means \pm standard error of mean (SEM) were used to describe all the response variables.

	Control	Synchro	eCG800	<i>P</i> -value
No. OPU Sessions	12	12	12	
Small Follicles Visualized	n=238 \pm 4.13 91.54%	n=261 \pm 3.70 97.39%	n=218 \pm 4.46 84.5%	0.827
Medium Follicle Visualized	n=15 ^{ab} \pm 0.39 5.77%	n=3 ^a \pm 0.13 1.12%	n=28 ^b \pm 0.58 10.85%	0.004
Large Follicles Visualized	n=7 \pm 0.15 2.69%	n=4 \pm 0.19 1.49%	n=12 \pm 0.49 4.65%	0.333
All Sizes Follicles Visualized	n=260 \pm 4.07 100%	n=268 \pm 3.67 100%	n=258 \pm 4.12 100%	0.987

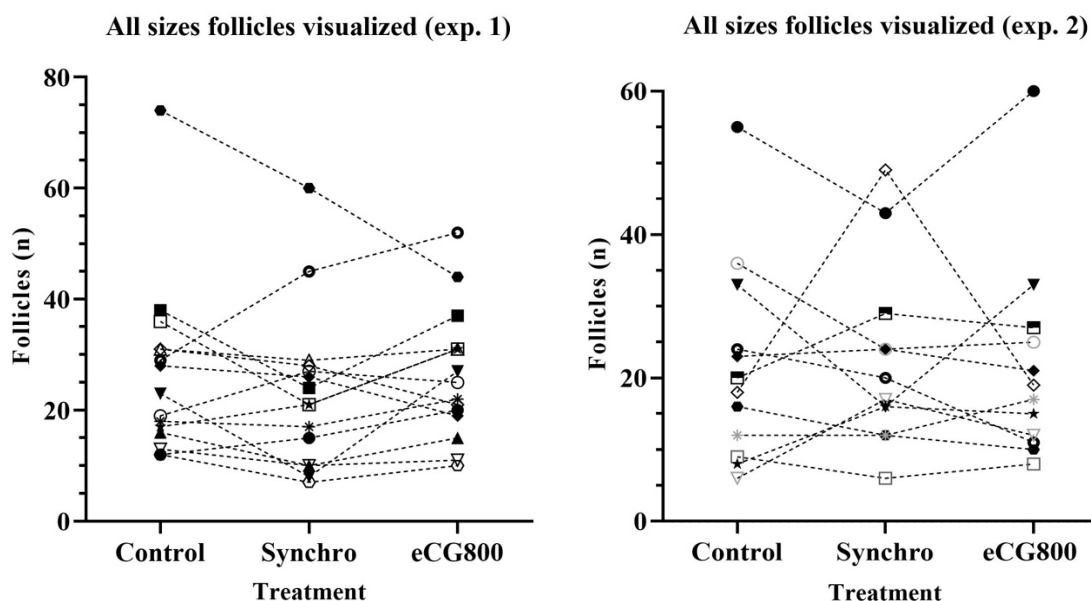


Figure 3. Dispersion of the quantity of all sizes follicles visualized at OPU moment in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800) in both experiments.

The number of aspirated follicles per donor per session was similar when comparing the three treatments ($P = 0.765$). As well as number of COC / donor / session ($P = 0.998$). Recovery rate ($P = 0.748$) and viable oocyte rate ($P = 0.384$) were alike, in tandem with the number of viable COCs per donor per session ($P = 0.987$; Table 4).

Table 4: Results (mean \pm SEM) of ovum pick-up (OPU) in Braford cows subjected to different treatments (control, Synchro and eCG800).

	Control	Synchro	eCG800	<i>P-value</i>
No. aspirated follicles / donor / session	21.5 \pm 4.09	22.33 \pm 3.67	21.08 \pm 3.77	0.973
No. COC / donor / session	10.75 \pm 4.31	12.53 \pm 3.02	12.53 \pm 3.95	0.998
Recovery rate (COC / aspirated follicles), %	50 \pm 9.22 129/258	47.01 \pm 8.27 126/268	49.80 \pm 7.74 126/253	0.748
Viable oocyte rate, %	62.79 \pm 0.10 81/129	65.87 \pm 0.10 83/126	70.63 \pm 0.09 89/126	0.384
No. viable COC / donor / session	6.75 \pm 3.42	6.91 \pm 2.57	7.41 \pm 3.35	0.987

Leaving chute side and approaching laboratory results, cleavage rate did not differ between treatments ($P = 0.249$) in spite of improvement for control ($n = 57/129$), Synchro ($n = 66/126$) and eCG800 ($n = 76/126$). Moreover, blastocyst rate on D7 showed tendency ($P = 0.075$) to improve from control ($n = 22/129$), to Synchro ($n = 30/126$) to eCG800 ($n = 47/126$; Fig. 4).

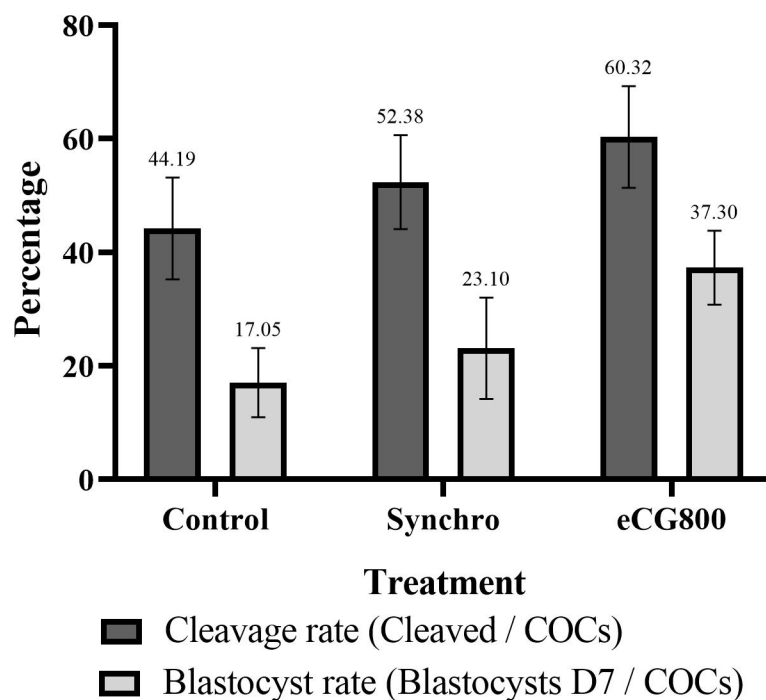


Figure 4. Evaluation of cleavage rate (cleaved structures / total COCs; $P = 0.249$) and blastocyst rate (blastocysts on day 7 / total COCs; $P = 0.075$) in Braford cows subjected to different treatments (Control, Synchro and eCG800). Standard error of mean (SEM) was used to describe all the response variables.

Excellent quality embryo rate ($P = 0.343$) and amount ($P = 0.306$) was similar among treatments, varying from $45.45\% \pm 7.93$ ($n = 10/22$), $56.67\% \pm 9.42$ ($n = 17/30$) to $55.31\% \pm 11.77$ ($n = 26/47$) for control, Synchro and eCG800 respectively.

Despite not having a statistical difference, there was a biological improvement of number of blastocysts ($P = 0.372$) and freezable ($P = 0.301$) embryos per donor per OPU session. Starting on 1.83 ± 0.06 and 0.83 ± 0.03 for control, 2.5 ± 0.06 and 1.42 ± 0.05 for Synchro, reaching 3.91 ± 0.12 and 2.17 ± 0.07 for eCG800 respectively.

4. Discussion

The increasement of oocyte competence has been associated with medium sized follicles (Ribas et al., 2018). The results of the present study confirm the positive effect of 800IU of eCG prior OPU in cows with synchronized follicular growth, showing more medium sized follicles (6 to 10 mm of diameter) on the moment of OPU. The blastocyst rate seven days after IVF showed tendency to improve when used 800IU of eCG. Although eCG shots did not demonstrated changes on oocyte maturation, they

proportioned more embryos per donor per OPU session leading to one more option to improve effectiveness of IVEP technique.

The application of gonadotropin hormones has the purpose to induce follicular growth and obtain more numbers and higher proportion of ideal follicles size (6 to 10 mm; Blondin et al., 2012). In this sense, donors treated with 800 IU of eCG increased numerically and proportionally medium sized follicles on the moment of OPU, similar data demonstrated by Vieira et al., (2014; 2016) using different doses of porcine follicle stimulant hormone (pFSH), despite the proportion found by them was higher than found by us (55%; 66% and 16.16%; 10.85%) respectively. Control treatment also had a large amount and proportion of that same size, which can be attributed to upcoming follicle deviation. However, none of the treatments resulted in more aspirated follicles nor more recovered or morphologically viable oocytes.

The dispersion of germinative vesicle stage in follicles is heterogenous (Lodde et al., 2007). Follicle size cannot assure oocyte development stage, as seen on different breeds on a random day of estrous cycle germinative vesicle stages were different (Soares et al., 2020a), but wave synchronization and follicle growth stimulation can bring more competent oocytes close to the same germinative vesicle stage (Soares et al., 2020b). It is expected for oocytes derived from larger follicles to be more competent, but in our study, none of the treatments overcame control results and the general oocyte competence development (BCB +) was higher (82.18%) than found by Otero et al., (2017) 57%; Alm et al., (2005) 58%; Silva et al., (2011) 65%; Pujol et al., (2004) 65.5%. Although they originated from high competence oocytes, nuclear (35.38%) and cytoplasmatic (53.84%) maturation were not as high as waited and they were lower than found by Silva et al., (2011) (40% and 64%) respectively. These last three variables were not affected by any treatment when evaluated through glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic activity, extrusion of first polar body and mitochondrial reorganization.

It is established that mono ovulatory species, such as bovines, that the follicular environment impacts on oocyte development capacity. When aspirating on a random day of estrous cycle, it is physiological to find a pre ovulatory follicle or one becoming dominant right after deviation (i.e. 15 days of luteal phase) which can be seen in the control group, leading to more atretic events on subordinated follicles. Once the dominant one is formed, it keeps growing and a final growth phase begins to allow endocrine signaling and ovulation (Sirard, 2011).

It was demonstrated that 800 IU of eCG can improve fertilization rate and decrease the rate of polyspermy (Ribas et al., 2018) which can be numerically seen in our study by the upgrade on the cleavage rate, and furthermore, the blastocyst rate after seven days of culture demonstrated an improvement starting from control going through Synchro and eCG800, that tended to have better results. This may be due a higher oocyte competence presented in larger than 6 mm follicle sizes. Considering that this effect can be attributed to the change in the profile of mRNA of genes related to quality of oocytes (Fernandes et al., 2021), the use of 800 IU of eCG or follicular wave synchronization can change patterns of COCs molecular phenotype.

Oocyte recovery rate was not affected by follicular size in the present study, although it has been reported by Vieira et al., (2014) and Ribas et al., (2018) that the increased volume and viscosity of follicular fluid and the greater intra-follicular pressure of larger follicles submitted to prior stimulation may hamper COC recovery. Yet the number of fresh transferable blastocysts on day 7 per donor per OPU more than double when donors were stimulated with 800 IU of eCG and increased 36.6% when donors had their follicular wave growth synchronized. Cavalieri et al., (2018) and Seneda et al., (2020) suggest that adjustments can be done to improve OPU programs, including cycle synchronization and hormonal stimulation to achieve better blastocyst yield. Considering only grade one embryos were submitted to slow freezing method (direct transfer), there also was an improvement of 71% from control to wave synchronization and a little more than 2.5 times from control to donors treated with 800 IU of eCG.

5. Conclusion

In summary, hypothesis was not accepted, but the synchronization of follicular wave plus the stimulation with 800 IU of eCG 72 hours before the moment of OPU provided more medium sized follicles to be aspirated. Moreover, it tended to have more blastocysts seven days after culture if 800 IU of eCG was given to donors or simply follicular wave was synchronized compared to control. This indicates one more alternative protocol to improve effectiveness on OPU/IVEP programs in Braford cows.

Acknowledgements

The authors give thanks to Zoetis Animal Health – Brazil by the donation of all the hormonal products applied in this study, In Vitro Rio Grande do Sul for providing the laboratory workspace and both farms (São Pedro, Uruguaiana - RS and Santa Branca, Santana do Livramento - RS) for the loan of the animals.

Funding

This work was financed in part by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and by the Post-Graduation Program in Animal Science at Universidade Federal do Pampa.

Declaration of Competing Interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest.

References

- Alm, H., Torner, H., Lohrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I.M., Kanitz, W. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63(8), 2194–2205, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.050.
- Ayres, H. 2008. Validação do escore de condição corporal e seu impacto na eficiência reprodutiva de vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, doi.org/10.11606/D.10.2008.tde-20022009-094146
- Bacelar, D., Max, M.C., Padilha, L.C., Barreiros, T.R.R., Seneda, M.M. 2010. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(1), 163-72 <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744095015.pdf>.
- Blondin, P., Vigneault, C., Nivet, A.L., Sirard, M.A. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers – What have we learned so far? *Animal Reproduction*, 9, 281-289.
- Bó, G., Cedeño, A., Mapletoft, R. 2019. Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 411-422. dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0042.
- Cavaliere, F.L.B., Morotti, F.; Seneda, M.M.; Colombo, A.H.B., Andreazzi, M.A., Emanuelli, I.P., Rigolon, L.P. 2018. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 117, 57-60, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026.

Fernandes, C.A. de C., Lopes, A.C., Gonçalves, F.C., Pereira, J.R., Guimarães, J.P. de A., Castilho, A.C. de S., Caixeta, E.S. 2021. Improvement in early antral follicle development and gene expression modulation prior to follicle aspiration in bovine cumulus-oocyte complexes by equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, v. 172, p.281-288.

Hendriksen, P.J.M., Vos, P.L.A.M., Steenweg, W.N.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*, 53, 11-20, doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00236-8.

Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reproduction*, 22, 1687–1695.

Lodde, V., Modina, S., Galbusera, C., Franciosi, F., Luciano, A.M. 2007. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Molecular and Reproduction Development*, 74, 740-749, doi.org/10.1002/mrd.20639.

LONERGAN, P. 1992. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.

Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., Tomanek, M. 2004 Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 61, 329–335, doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4.

Maciel, A.B.M. 2006. Proposta de avaliação da condição corporal em vacas Holandesa e Nelore. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, São Paulo. hdl.handle.net/11449/95292.

Morotti, F., Sanches, B.V., Pontes, J.H., Basso, A.C., Siqueira, E.R., Lisboa, L.A., Seneda, M.M. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, 81, 696–701, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002.

Nawaz, M., Saleem, M., Ullah, F., Shabbir Khan, G., Zahoor, I., Ahmad, N., Riaz, A. 2022. Exogenous progesterone-dependent modulation in the follicular dynamics of *Bos indicus* cattle undergoing repeated ovum pick-up sessions. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(1), 55-63, doi.org/ 10.1111/rda.14028.

Otero, A.R., Costa, P.E., Pereira, M.E. 2017. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(2), 345-354. doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.617

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruij, T.A., Wurth, Y.A., Van Beneden, T.H., Willemse, A.H., Taverne, M.A.M. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35, 19-24, doi.org/10.1016/0093-691X(91)90426-E.

Pontes, J.H.F., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C., Seneda, M.M. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75, 1640-1646, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026

- Pujol, M., López-Béjar, M., Paramio, M.T. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735-744.
- Ribas, B.N., Missio, D., Roman Júnior, I., Neto, N.A., Claro Júnior, I., Brum, D. dos S., Leivas, F.G. 2018. Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195, 284-290, doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.006.
- Sartori, R.; Barros, C. M. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reproduction. Sci.* 124, 244–250. doi.org/10.1016/j. anireprosci.2011.02.006
- Seneda, M.M., Zangirolamo, A.F., Bergamo, L.Z., Morotti, F. 2020. Wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 150, 180-185, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.024.
- Silva, D.S., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N.S., Rodrigues, J. L. 2013. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, 21(3), 250-255. doi.org/10.1017/S0967199411000487.
- Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227–243.
- Sirard, M.A. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(6), 483-488. doi.org/10.1007/s10815-011-9554-4.
- Soares, A.C.S., Marques, K.N.G., Bragança, L.G.M., Lodde, V., Luciano, A.M., Buratini, J. 2020b. Synchronization of germinal vesicle maturity improves efficacy of in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 154, 53-58, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.030.
- Soares, A.C.S., Sakoda, J.N., Gama, I.L., Bayeux, B.M., Lodde, V., Luciano, A.M., Buratini, J. 2020a. Characterization and control of oocyte large-scale chromatin configuration in different cattle breeds. *Theriogenology*, 141, 146-152, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.020.
- Stojkovic, M., Machado, S., Stojkovic, P., Zakartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P., Wolf, E., Stojkovic, M. 2001. 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*, 64(3), 904-909, doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904.
- Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Netto, A.C., Guerreiro, B.M., Silveira, C.R.A., Moreira, R.J.C., Sá Filho M.F., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Baruselli, P. S. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318-324. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013
- Vieira, L. M., Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Netto, A. C., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Freitas, B. G., Bragança, L.G.M., Marques, K.N.G., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., Mapletoft, R.J. Baruselli, P. S. 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*, 85(5), 877-886. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.036

6. CONCLUSÃO

A hipótese não foi aceita, porém a sincronização da onda folicular associado a estimulação com 800 UI de eCG 72 horas antes do momento da aspiração folicular proporcionou uma maior quantidade de folículos de tamanho médio (6 a 10mm) para serem aspirados. Também, houve uma tendência em se obter mais blastocistos sete dias após o cultivo se 800 UI de eCG foi aplicado nas doadoras ou simplesmente se a onda folicular foi sincronizada quando comparadas ao controle. Isso indica mais uma alternativa de protocolo para melhorar a eficiência em programas de aspiração folicular e produção de embriões *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEIC. **Beef Report, Perfil da Pecuária no Brasil 2022**, São Paulo, Brasil, 2022.
- ALLEN, W. R. e STEWART, F. Equine chorionic gonadotropin. Em **Equine Reproduction**; MCKINNON, A. O. e VOSS, J. L. (eds). Lea and Febiger: Philadelphia, PA, USA, p.81-94,1993.
- ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reprod. Camb.** v.123, p.445–453, 2002.
- ALLER, J. F.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; CALLEJAS, S. S.; ALBERIO, R. H. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.10–5. 2012
- ALM, H.; TORNER, H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I. M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v.63 (8), p.2194–2205, 2005.
- BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina – PR, p.146-167, 2008.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47 (4), p.134-141, 2012.
- BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v.67 (2), p. 341-345, 2007.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.

A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66 (1), p.38–43, 2002.

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A. L.; SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers – What have we learned so far? **Animal Reproduction**, v.9, p.281-289, 2012.

BÓ, G.; CEDEÑO, A.; MAPLETOFT, R. Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. **Animal Reproduction**, v.16 (3), p.411-422, 2019.

BREVINI, T. A.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.23–38, 2007.

CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; COLONBO, A. H. B.; ANDREAZZI, M.A.; EMANUELLI, I. P.; RIGOLON, L. P. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v.117, p. 57-60, 2018.

CEREZETTI, M. B.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C. B.; DA SILVA, C. B.; SENEDA, M. M. Alternativas para Substituição do uso de Implantes Vaginais de Progesterona na Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Bovinos. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.6, p.416-433, 2019.

CHAUBAL, S. A.; FERRE, L. B.; MOLINA, J. A.; FABER, D. C.; BOLS, P. E.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, v.67, p.719-728, 2007.

Da SILVA, J. C. B.; FERREIRA, R. M.; MATURANA FILHO, M.; NAVES, J. de R.; SANTIN, T.; PUGLIESI G.; MADUREIRA, E. H. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and *in vitro* embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v.90, p.65–73, 2017.

De RENSIS, F. e LOPEZ-GATIUS, F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49 p.177-182, 2014.

DIECI, C.; LODDE, V.; LABREQUE, R.; DUFORT, I.; TESSARO, I.; SIRARD, M. A.; LUCIANO, A. M. Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve *in-vitro* bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v.22, p.882-897, 2016.

EGASHIRA, J.; IHARA, Y.; KHATUN, H.; WADA, Y.; KONNO, T.; TATEMOTO, H.; YAMANAKA, K. Efficient *in vitro* embryo production using *in vivo*-matured oocytes from super stimulated. **Journal of Reproduction and Development** v.65 (2), p.183-190, 2019.

ELLIFF, F. M.; GUIMARÃES, E. C.; FÉRES, L. F.; BAYEUX, B. M.; COLLI, M. H. A.; BARUSELLI, P. S. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on *in vitro* embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.31, p.191, 2019.

ERICSSON, S. A.; BOICE, M. L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B. N. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. **Theriogenology**, v.39, p. 214, 1993.

FERNANDES, C. A. de C.; LOPES, A. C.; GONÇALVES, F. C.; PEREIRA, J. R.; GUIMARÃES, J. P. de A.; CASTILHO, A. C. de S; CAIXETA, E. S. Improvement in

early antral follicle development and gene expression modulation prior to follicle aspiration in bovine cumulus-oocyte complexes by equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 172, p.281-288, 2021.

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STRØBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P. J. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v.14(5), p.991-1004, 2020.

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M. M.; ALBERTINI, D. F.; LUCIANO, A. M. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction**, v.91 (3), p.61 1-9, 2014.

GARCIA, S. M.; MOROTTI, F.; CAVALIERI, F. L. B.; LUNARDELLI, P. A.; SANTOS, A. O.; MEMBRIVE, C. M. B.; CASTILHO, C.; PUELKER, R. Z.; SILVA, J. O. F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. **Animal Reproduction Science**, v.221, p.106601, 2020.

GONÇALVES, F. C.; FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S.; CAIXETA, E. S.; PALHÃO, M. P.; NEVES, J. P.; COSTA, D. S. Ovum pick up and quality of oocytes in stimulated donors with equine chorionic gonadotropin. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 735, 2017.

GOODHAND, K. L.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S.; BROADBENT, P. J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.145–58. 2000.

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v.51, p.449-59, 1999.

HOPPEN, H. O. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin — An overview. **Exp. Clin. Endocrinol.** v.102 p.235–243, 1994.

HYTTEL, P; GREVE, T; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p.35–47, 1989.

JESETA, M.; KNITLOVA, D. C.; HANZALOVA, K.; HULINSKA, P.; HANULAKOVA, S.; MILAKOVIC, I.; NEMCOVA, L.; KANKA, J.; MACHATKOVA, M. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49(3), p. 469-475, 2014.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; HELEIL, B.; TUCHSCHERER, A.; RYNSKA B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.75, p.662–670, 2011.

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

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A. M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular and Reproduction Development**, v.74, p.740-749, 2007.

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 and Reproduction Development**, v.53, p.48-53. 1994.

LUCIANO, A. M. e SIRARD, M. A. Successful *in vitro* maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biology of Reproduction**, v.98(2), p.162-169, 2018.

MACLELLAN, L. J.; WHYTE, T. R.; MURRAY, A.; FITZPATRICK, L. A.; EARL, C. R.; ASPDEN, W. J.; J E KINDER, J. E.; GROTTJAN, H. E.; WALSH, J.; TRIGG, T. E.; D'OCCHIO, M. J. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) calves: effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. **Theriogenology**, v.49, p.1317-1329, 1998.

MARTINS, C. M.; REIS, P. O.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; BARUSELLI, P. S. Effect of follicular growth wave synchronization and treatment with bST or eCG in the OPU-IVP of Nelore, Brangus and Holstein donors. **Animal Reproduction**, v.9, p.563. 2012.

MERTON, J. S.; ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry, **Theriogenology**, v.15;59(2), p.651-674, 2003.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v.9, p.223-230, 2012.

MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34(2), p.3867-3875, 2013.

MOROTTI, F.; CAVALIERI F. L. B.; SENEDA, M. M.; ANDREAZZI, M. A.; MESSIAS, D. M. P.; COLOMBO, A. H. B. Improvement of IVEP program with follicular wave synchronization in cows with high antral follicle count. **Animal Reproduction**, Anais do XXXIV Encontro da SBTE, OPU e TE, v.17(3), p.1, 2020.

NIVET, A. L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, v.143(2), p.165, 2012

ONGARATTO, F. L.; CEDEÑO, A. V.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; TRIBULO, A.; BÓ, G. A. Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and *in vitro* embryo production in beef donor cows. **Animal Reproduction Science**, v.214, 2020.

ONGARATTO, F. L.; TRIBULO, A.; BÓ, G. A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Animal Reproduction**, v.12, p.876-883, 2015.

- OPIELA, J.; KAŃSKA-KSIAŹKIEWICZ, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). **Reproductive Biology**, v.13(3), p.177-183, 2013.
- OPIELA, J.; LIPIŃSKI, D.; SŁOMSKI, R.; KAŃSKA-KSIAŹKIEWICZ, L. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Animal Reproduction Science**, v.118(2-4), p.188-193, 2010.
- PELLEGRINO, C. A. G., MOROTTI, F., UNTURA, R. M., PONTES, J. H. F., PELLEGRINO, M. F. O., CAMPOLINA, J. P.; SENEDA, M. M.; BARBOSA, F. A.; HENRY, M. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v.86(3), p.888-893, 2016.
- PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.
- PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M. T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v.61(4), p.735-744, 2004.
- REIS, P. O.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Effect of synchronization at the beginning of follicular wave emergence on OPU-IVP of Nelore (*Bos indicus*) and Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*) **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.764. 2010.
- RIBAS, B. N.; MISSIO, D.; ROMAN JÚNIOR, I.; NETO, N. A.; CLARO JÚNIOR, I.; BRUM, D. dos S.; LEIVAS, F. G. Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.195, p.284-290, 2018.
- SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.132-139, 2011.
- SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v.85(6), p.1147-1151, 2016.
- SÁNCHEZ, F. e SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1822(12), p.1896–1912, 2012.
- SARTORI, R. e BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reproduction. Sci.** v.124, p.244–250, 2011.
- SARWAR, Z.; SAAD, M.; SALEEM, M.; HUSNAIN, A.; RIAZ, A.; AHMAD, N. Effect of follicle size on oocytes recovery rate, quality, and *in-vitro* developmental competence in *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction**, v. 17(3), p.1-9, 2020a.
- SARWAR, Z.; SAGHEER, M.; SOSA, F.; SAAD, M.; HASSAN, M.; HUSNAIN, A.; ARSHAD, U. Meta-analysis to determine effects of treatment with FSH when there is progestin-priming on in-vitro embryo production using ovum pick-up in *Bos taurus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 221, 2020b.

- SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.208–14. 2008.
- SENEDA, M. M.; BLASCHI, W.; RUBIN, K. C. P.; LISBOA, L. A. Aspiração Folicular *In Vivo*: metodologias, eficiência e sequelas. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, Brasil, 2005.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37–43. 2001.
- SENEDA, M. M.; ZANGIROLAMO, A. F.; BERGAMO, L. Z.; MOROTTI, F. Wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v.150, p.180-185, 2020.
- SIRARD, M. A. Folliculogenesis and acquisition of oocyte competence in cows. **Animal Reproduction**, v.16(3), p.356-356, 2019.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126–136, 2006.
- SIRARD, M. A. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. **Theriogenology**, v.86, p.54-61, 2016.
- SINGH, J.; DOMINGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology** v.62, p.227–243, 2004.
- SOARES, A. C. S.; MARQUES; K. N. G.; BRAGANÇA; L. G. M.; LODDE, V.; LUCIANO, A. M.; BURATINI, J. Synchronization of germinal vesicle maturity improves efficacy of *in vitro* embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v.154, p.53-58, 2020a.
- SOARES, A. C. S.; SAKODA, J. N.; GAMA, I. L.; BAYEUX, B. M.; LODDE, V.; LUCIANO, A. M.; BURATINI, J. Characterization and control of oocyte large-scale chromatin configuration in different cattle breeds. **Theriogenology**, v.141, p.146-152, 2020b.
- SONNEWEND, F.; ANDRADE, J. P. N.; REZENDE, R. A.; BORGES, A. N.; SILVA, A. L.; MELLO, M. R. B. Impact of injectable P4 and eCG protocol before OPU on *in vitro* production of bovine embryos. **Animal Reproduction**. v.13, p.472. 2016.
- SOUZA, A. C. C.; COSTA, C. B.; SILVA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. Influência da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* – Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43(1), p.13-17, 2019.
- STATISTA, **Trade value of leading beef exporters worldwide in 2020 (in billion U.S. dollars)** *. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/917207/top-exporters-of-beef-global/>>. Acesso em: 07/08/2021.
- VIANA, J. H. M. 2019 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 38(4), 2020.

VOS, P. L. A. M.; HENDRIKSEN, P. J. M.; DIELEMAN, S. J. IVP results of oocytes from eCG-stimulated bovine follicles at the time of the preovulatory LH surge are severely affected by the system of aspiration. **Theriogenology**, v.51 (1), p.310, 1999.

WATANABE, Y.; SOUZA, H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R.; BATISTA, E. O. S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.; FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, v.14(3), p.635-644, 2017.

WILSHER, S. e ALLEN, W. R. Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. **Equine Vet. J.** v.43, p.430–438. 2011.

WORKMAN, D. **Top Beef Exporting Countries**, Disponível em: <<https://www.worldstopexports.com/top-beef-exporting-countries/>>, Acesso em 07/08/2021.