



Análise quantitativa e qualitativa de oócitos produzidos por novilhas super precoce e sua conversão embrionária. Quantitative and qualitative analysis of oocytes produced by super precocious heifers and their embryonic conversion.

[Lucas Martins Roveda](#)^{1*}, [Lucas Winter de Almeida Soares](#)², [Sallomão Dhankel dos Santos Lima](#)², [Giancarlo Rieger](#)³

¹- Discente do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade Marechal Rondon – FARON, Vilhena/RO, Brasil. E-mail: lucasrodevah@gmail.com

²- Discente do Curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal de Rondônia – IFRO, *campus* Jaru, Jaru/RO, Brasil.

³- Docente do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade Marechal Rondon – FARON, Vilhena/RO, Brasil.

Resumo

A eficiência reprodutiva desempenha nas fêmeas um papel fundamental na sustentabilidade econômica dos rebanhos de bovinos de corte, principalmente em características relacionadas a precocidade sexual de novilhas, com a crescente utilização da produção *in vitro* (PIVE) de embriões. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade oocitária e de embriões produzidos de novilhas nelore com idade de 11 e 12 meses submetidas ao desafio de precocidade, aspiradas previamente a estação de monta. O estudo foi realizado nos meses de setembro e outubro de 2023, em uma fazenda localizada no município de Vilhena-RO, os animais foram submetidos a um regime de pastagem predominantemente formada por *Brachiaria* e recebiam suplementação proteica com consumo 0,6% do peso vivo acrescido de silagem de capim Miyagi. As aspirações foliculares decorreram pela manhã, com intuito de não influenciar de forma negativa a temperatura ambiente. Para conduzir a pesquisa, foram utilizados 23 animais submetidos ao processo de aspiração folicular. Posteriormente, os oócitos foram encaminhados ao laboratório para seleção, maturação e fecundação. No laboratório, realizou-se a seleção desses oócitos para classificar os viáveis e fecunda-los, ao total foram coletados 562 oócitos viáveis que converteram em 129 embriões aptos a transferência. A conversão oocitária foi de 22,9% número relativamente considerável se comparado a conversão de matrizes adultas. É evidente, portanto, que a aspiração folicular de novilhas super precoce pode ser utilizada em programas melhoramento genético, visto que a qualidade oocitária desses animais viabiliza o processo de ganho genético e avanço de gerações.

Palavras-chave: Aspiração folicular. Produção de embriões. Reprodução.

Abstract

Reproductive efficiency in females plays a fundamental role in the economic sustainability of beef cattle herds, mainly in characteristics related to the sexual precocity of heifers, with the increasing use of *in vitro* production (IVP) of embryos. The present study aimed to evaluate the quality of oocytes and embryos produced from Nelore heifers aged 11 and 12 months submitted to the precocity challenge, aspirated before the assembly station. The study was carried out in the months of September and October 2023, on a farm located in the municipality of Vilhena-RO, the animals were subjected to a pasture regime predominantly formed by *Brachiaria* and received protein supplementation with consumption of 0.6% of live weight added with Miyagi grass silage. Follicular aspirations took place in the morning, with the aim of not negatively influencing the ambient temperature. To conduct the research, 23 animals were used that underwent the follicular aspiration process. Subsequently, the oocytes were sent to the laboratory for selection, maturation and fertilization. In the laboratory, these oocytes were selected to classify the viable ones and fertilize them. In total, 562 viable oocytes were collected, which were converted into 129 embryos suitable for transfer. Oocyte conversion was 22.9%, a relatively considerable number compared to the conversion of adult matrices. It is evident, therefore, that follicular aspiration of super early heifers can be used in genetic improvement programs, since the oocyte quality of these animals makes the process of genetic gain and generational advancement viable.

Keywords: Follicular aspiration. Embryo production. Reproduction.

Introdução

Para suprir as necessidades do mercado quanto a quantidade e qualidade, o pecuarista que tem como objetivo aumentar a eficiência reprodutiva de seus rebanhos, lança mão de investimentos em melhoramento genético juntamente com as biotecnologias da reprodução (FREITAS, 2023). Em 1982 nasceu e se desenvolveu normalmente o primeiro bezerro produzido através do processo de fertilização *in vitro* (FIV) (BRACKETT et al., 1982), porém com o financiamento das empresas Beabisa Agricultura LTDA e Gretec Tecnologia de Embriões para o fundo de inovações tecnológica deu início a comercialização no ano de 1998 (GALLI, 2003). As técnicas de PIVE na espécie bovina são aprimoradas constantemente devido as altas demandas de embrião pelo mercado da pecuária, o que torna a biotécnica um destaque no cenário mundial da reprodução animal, ultrapassando as outras biotecnologias reprodutivas (DAYAN, 2001). A utilização da PIVE permitiu que fosse encurtado o tempo do melhoramento genético em até 10 anos, pois possibilita explorar ao máximo o potencial reprodutivo das fêmeas bovinas de alto valor zootécnico e com isso, reduz os intervalos que existem entre as gerações e eleva o número de descendentes (SILVA et al., 2015; SOUZA, 2019).

A PIVE é composta por diversas etapas as quais irão influenciar de maneira direta no resultado final, nessas etapas estão a aspiração folicular –colheita oocitária –e a seleção de oócitos imaturos, maturação dos oócitos *in vitro* (MIV), fertilização dos oócitos maturados com espermatozoides que foram capacitados e desenvolvidos *in vitro* (FIV) e depois, a transferência dos embriões a fresco ou a criopreservação. A colheita oocitária possibilita a obtenção dos oócitos em grandes quantidades (MACHATY et al., 2012). A colheita dos oócitos em bovinos pode ser realizada através da Ovum Pick Up, conhecida como aspiração folicular (OPU), a qual é realizada guiada por ultrassom com o auxílio de um transdutor vaginal, que irá perfurar os ovários e coletar os oócitos (GONÇALVES et al., 2008).

Após ser realizada a colheita dos oócitos o seguinte passo é rastrear e então classificar os oócitos, para classificá-los devem ser avaliados o aspecto morfológico dos complexos cumulus-oócitos (CCO). Viana et al. (2004) descreveu cinco graus de qualidade oocitária e segue alguns critérios os quais são avaliados para decidir se o oócito poderá ser levado a maturação e fertilização. Esses graus são: Grau I: O CCO é compactado e possui mais de três camadas de células do cumulus e os oócitos tem o citoplasma homogêneo. O núcleo apresenta uma coloração clara e aparente; Grau II: O CCO é compactado e possui três ou menos camadas de células do cumulus e os oócitos tem o citoplasma ligeiramente heterogêneo; Grau III: Halo transparente ao redor do ovócito e parcialmente desnudos; Grau IV: desnudos e com cúmulos expandido ao redor do oócito; Grau V: Atrésico, não apresentam células dos cúmulos e podem apresentar granulações. Mariano et al. (2015) e Penitente Filho (2013) afirmam que os oócitos classificados como Grau I e II são os ideais para serem maturados e fertilizados pois tem maior probabilidade de progredirem a um embrião e o Grau III pode ser utilizado em casos que forem recuperados poucos oócitos, porém apresentam baixa taxa de viabilidade, Grau IV e V são descartados pois não são viáveis.

Existem inúmeros fatores que podem contribuir para a redução da taxa de produção de embriões *in vitro*, como a obtenção dos oócitos imaturos *in vivo*, o fator idade da doadora, transporte dos oócitos até o laboratório e a má seleção dos oócitos (GOTTARDI, 2009). O método de classificação morfológica é imprescindível para a seleção dos embriões satisfatórios à transferência a fresco e/ou criopreservação. Estruturas que apresentam adequado crescimento são consideradas aptas ao desenvolvimento pós-implantacional e possuem maior tolerância ao congelamento (SOUZA,

2018). Os critérios de classificação são definidos pelas qualidades e estágios de desenvolvimento dos embriões, que são divididos em categorias (BATISTELA, 2023).

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de novilhas super precoce no programa de aspiração e transferência de embriões. Tendo em vista a qualidade dos oócitos coletados e embriões produzidos *in vitro* por esses animais. A técnica de aspiração folicular (Ovum Pick Up - OPU), seguida pela seleção e classificação morfológica dos oócitos, é fundamental para garantir a viabilidade dos embriões produzidos.

Material e métodos

Este estudo foi conduzido através de dados retrospectivos disponibilizados pela fazenda Modotti localizada no Município de Vilhena-RO. Os animais foram submetidos a um regime de pastagem predominantemente formada por *Brachiaria* e receberam suplementação proteica com consumo 0,6% do peso vivo acrescido de silagem de capim Miyagi. Para conduzir a pesquisa, foram utilizados dados retrospectivos de 23 animais genotipados da raça Nelore com 11 e 12 meses de idade que foram submetidos ao processo de aspiração folicular nos meses de setembro e outubro de 2023. Após a aspiração, os oócitos foram encaminhados ao laboratório para seleção, maturação e fecundação. As aspirações foliculares foram realizadas com auxílio de equipamento de ultrassom portátil equipado com transdutor setorial de 7,5 MHz adaptado para exame intravaginal e com guia para agulha de biópsia. Agulhas descartáveis (20 G) acopladas a um sistema de vácuo com pressão aproximada de 50 mmHg ou equivalente ao fluxo de 11 ml por minuto. O líquido folicular e os complexos cumulus-oócitos foram aspirados para um tubo de 50 ml contendo 10 ml de Dulbecco's PBS (DPBS), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e 100UI de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça), e aquecido a 36°C. Todos os oócitos recuperados foram mantidos em crio tubos devidamente identificados com meio tamponado, e transportados para o laboratório no intervalo de 3 a 12 horas a 37°C.

Contagem e seleção dos oócitos

Para a classificação foi utilizada a metodologia de Viana et al. (2004). Os oócitos foram classificados de acordo com citoplasma e o número de camadas de células do cumulus segundo os critérios a seguir:

Grau I: O CCO é compactado e possui mais de três camadas de células do cumulus e os oócitos tem o citoplasma homogêneo. O núcleo apresenta uma coloração clara e aparente;

Grau II: O CCO é compactado e possui três ou menos camadas de células do cumulus e os oócitos tem o citoplasma ligeiramente heterogêneo;

Grau III: Halo transparente ao redor do ovócito e parcialmente desnudos;

Grau IV: Desnudos e com cúmulos expandido ao redor do oócito;

Grau V: Atrésico, não apresentam células do cumulus e podem apresentar granulações.

Produção *in vitro* de embriões

A maturação *in vitro* dos COC foram realizadas em meio TCM 199 (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino, FSH, LH e estrógeno, piruvato e antibiótico, na estufa incubadora a 38,8 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas. Os oócitos de cada doadora foram colocados em gotas separadas em grupos de 1 a 30 por gota. Os COC maturados foram fecundados utilizando sêmen de touros provados. Para preparação dos espermatozóides foi utilizado

o método do gradiente de Percoll (Invitrogen). A fecundação foi realizada em meio FIV contendo heparina, por um período de aproximadamente de 18-22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação. Para o cultivo dos presumíveis zigotos, foram utilizados CR4aa contendo, soro fetal bovino e BSA. No terceiro dia foi realizado o processo de clivagem, que é a separação das estruturas onde ocorreu a fecundação, as demais estruturas que não virarem zigoto foram desprezadas. Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições da fecundação. No sétimo dia de cultivo os blastocistos foram avaliados, classificados quanto ao estágio de desenvolvimento (Mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido). Figura 1 representa a localização da fazenda Modotti em uma visão panorâmica ao Brasil.



Figura 1 - Localização da fazenda Modotti. Fonte: Google Maps.

Resultados e discussão

Em um total de 632 oócitos coletados, 89% estavam viáveis, o que corresponde a 562 oócitos submetidos ao processo de fecundação. Os oócitos que tiveram classificação de I a III seguiram para FIV, os mais IV e V foram desprezados. Os dados correspondem aos oócitos aspirados, viáveis e total de embriões produzidos (Tabela 1).

Oócitos considerados viáveis graus I, II e III; inviáveis grau IV e V degenerados ou expandidos. A porcentagem de oócitos viáveis aspirados das novilhas super precoce foi de 88,5%. Em um estudo conduzido por (BATISTA et al., 2016) obteve resultado similar, encontrando índices

de 82 e 85% de oócitos viáveis em dois grupos de animais avaliados. Ademais, a qualidade dos gametas da categoria estudada justifica uma maior viabilidade se comparada a animais senis. Existem vários fatores que influenciam na coleta dos oócitos, os quais são fundamentais para a maximização da taxa de recuperação dos mesmos. O grau de qualidade e a quantidade dos oócitos podem ser alterados pela raça, idade, estágio reprodutivo, condições climáticas, características foliculares, e condições experimentais que envolvem todo o processo de retirada e transporte dos ovários até a aspiração folicular, incluindo a habilidade técnica e o tempo que leva todo esse processo. Desse modo, em um estudo conduzido por Quintal et al. (2022) observou que a produção de oócitos de novilhas pré-púberes Holandesas foi inferior a produção das vacas a avaliadas.

Tabela 1 - Total de oócitos coletados e viáveis

Categoria	Total aspirado	Viáveis	Inviáveis	% de inviáveis
Novilha	632	562	70	11,5%

Um estudo conduzido por Silva (2021) avaliou a produção de oócitos de novilhas pré-púberes, com idade de 11 meses e obteve resultado de 28,93 oócitos aspirados por animal, valor similar ao encontro nesse estudo que foi de 27,47. Ademais, a viabilidade desses oócitos foi de 20,60 tendo viabilidade de 71%, valor inferior ao encontrado de 88,5% fato que se deve a nutrição dos animais, o autor cita que o escore de condição corporal dos animais avaliados influenciou nos resultados obtidos. Com relação aos folículos médios (5-8mm) e grandes (>8mm), foi observado menor quantidade nas novilhas se comparado aos animais adultos com dados da literatura. Esse resultado pode ser explicado devido as novilhas pré-púberes apresentarem imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise, que causa diminuição na concentração de hormônios responsáveis pelo crescimento folicular (SANTOS et al., 2016), acarretando em baixo desenvolvimento, e por isso as novilhas pré-púberes tendem a apresentar folículos com menor diâmetro quando comparado com doadoras mais velhas.

Estudo conduzido por Guerreiro (2015), avaliou o número de folículos aspirados de doadoras de diferentes categorias e não observou diferença estatística, bem como Silva (2020) mencionou não ter diferença entre a idade da doadora e quantidade de oócitos produzidos, corroborando com os resultados obtidos nessa pesquisa, onde a produção folicular de novilhas com idade de 11 e 12 meses não divergiu com a literatura quanto a produção de oócitos de animais adultos viabilizando a utilização dessa categoria em programas de transferência de embriões em fazendas quanto a produção oocitária. Os dados provenientes da conversão embrionária estão correlacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Conversão embrionária

Categoria	Oócitos fecundados	Embriões obtidos	% de conversão
Novilha	562	129	22,9%

Um estudo realizado por Pires (2023), observou uma conversão embrionária de 30,8% em vacas da raça nelore, o que demonstra valores acima dos que foram encontradas na pesquisa realizado com novilhas, algo que pode ter relação com o método de coleta, cultivo ou pela qualidade dos sêmen utilizado e idade do animal. Segundo Pinheiro et al. (2024), a produção média de oócitos viáveis por doadora 29,94 e a conversão em embriões foi de 10,01 se tratando de animais adultos da raça Nelore e Senepol, valores acima dos encontrados na presente pesquisa, algo influenciado pela idade e categoria animal avaliada, A produção média por novilha precoce foi de 24,43 viáveis e a conversão de 5,60 embriões por doadora.

Em relação a produção embrionária, ou seja, blastocistos por OPU e taxa de blastocistos, Camargo et al. (2005) relataram que novilhas pré-púberes apresentaram menor taxa de blastocisto, quando comparadas a vacas. Desta forma, o resultado observado no presente estudo está de acordo com a literatura, mas pode-se interpretá-lo de maneira positiva, uma vez que o valor encontrado pode viabilizar a utilização desses animais. Quanto ao número de blastocistos produzidos e taxa de blastocistos, indica que a utilização de fêmeas pré-púberes ou púberes não afetará a PIVE. Diante disso, a utilização de novilhas super precoce como doadora no programa de transferência é critério de cada fazenda adotar ou não essa categoria, visto que os valores de produção embrionária desses animais é relativamente inferior. No entanto, doadoras jovens possibilitam provar geneticamente esses animais de forma precoce, aumentando a confiabilidade do rebanho.

Conclusão

A categoria de novilhas super precoce possui uma taxa de produção oocitária e conversão embrionária inferior a produção de vacas. No entanto, a utilização estratégica dessa categoria pode ser adotada em programa de transferência de embriões visando menor intervalo entre as gerações.

Conflitos de interesse

Não houve conflito de interesses dos autores.

Contribuição dos autores

Lucas Martins Roveda – coleta de dados, interpretação dos resultados e redação; Lucas Winter de Almeida Soares – coleta de dados e interpretação dos resultados; Sallomão Dhankel dos Santos Lima – coleta de dados; Giancarlo Rieger – verisão do texto, orientação e correções.

Apoio financeiro

Faculdade de Medicina Veterinária Marechal Rondon – FARON.

Agradecimentos

A Faculdade de Medicina Veterinária Marechal Rondon – FARON – e as empresas fornecedoras dos insumos.

Referências bibliográficas

BATISTA, J. F.; SILVA, L. F.; LAZARI, L. P.; LEAL, M. G. O.; SOUZA, M. M.; GARCIA, S. M. Avaliação morfológica e nuclear de oócitos bovinos imaturos, obtidos de ovários com e sem a presença de corpo lúteo. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n. 2, p. 1-10, 2016. <https://journal.unoeste.br/index.php/ca/article/view/1764>

- BATISTELA, M. V. V.; PEREIRA, J. L. S. A.; NASCIMENTO, V. A.; DIAS, M. Produção *in vitro* de embriões e novas estratégias na produção de oócitos em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 20, n. 46, p. 201-233, 2023. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2023D17
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A. M.; VALE FILHO, V. R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 53-59, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.020>
- DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. 56f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001. <http://hdl.handle.net/11449/98230>
- FREITAS, V. P. **Fatores que afetam a perda de gestação de embriões de bovinos de corte produzidos *in vitro***. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/37684>
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)
- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2008, 408p.
- GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94>
- GUERREIRO, B. M. **Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa**. 64f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-24072015-120811/pt-br.php>
- MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 937-950, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
- MARIANO, R. S. G.; USCATEGUI, R. A. R.; NOCITI, R.; BARROS, F. P. D. C.; RODRIGUEZ, M. G. K.; TAIRA, A. R.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; TEIXEIRA, P. P. M. Aspiração folicular em ruminantes – revisão de literatura. **Revista Investigação**, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/318658928>
- PENITENTE FILHO, J. M.; OLIVEIRA, F. A.; JIMENEZ, C. R.; TORRES, C. A. A. **Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013, 15p. <https://www.researchgate.net/publication/255687448>

PINHEIRO, A. K.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; SATRAPA, R. A.; SILVA, M. S.; GREGIANINI, J. T. F.; GREGIANINI, H. A. G.; CARNEIRO, G. A. M. Parâmetros genéticos da produção *in vitro* de embriões das raças Nelore e Senepol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 25, 77620P, 2024. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v25e-77620P>

PIRES, A. P. A. **Interações ambientais e genéticos afetam a produção *in vitro* de embriões bovinos**. 51f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2023. <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/4479>

QUINTAL, A.; VASCONCELOS, A. B.; QUEIROZ, A. U. P.; BATISTA, A. C. F.; QUINTAL, A. P. N. Avaliação métrica da zona pelúcida relacionada à viabilidade celular de oócitos bovinos. **Pubvet**, v. 16, n. 5, p. 1-5, 2022. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n05a1103.1-5>

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. B.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 165, p. 17-21, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.024>

SILVA, J. S.; BORGES, L. S.; MARTINS, L. E. L. L.; LIMA, L. A.; BARBOSA, Y. G. S.; SILVA, N. A.; BRITO, T. K. P. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização *in vitro* em bovinos - revisão. **Nutritime**, v. 12, n. 5, p. 4316-4319, 2015. <https://www.nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-332.pdf>

SILVA, L. G. **Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH**. 68f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-13052020-093248/pt-br.php>

SILVA, M. O. **Efeito da idade de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) na produção *in vitro* de embriões e taxa de gestação**. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, Nova Odessa, 2021. <https://iz.agricultura.sp.gov.br/pdfs/1618605031>

SOUZA, N. S.; ABADE, C. C. Produção *in vitro* de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019. <http://publicacoes.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/988>

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JUNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.002>

Recebido em 2 de outubro de 2024
Retornado para ajustes em 22 de maio de 2025
Recebido com ajustes em 28 de maio de 2025
Aceito em 20 de junho de 2025