

FATORES QUE INFLUENCIAM A TAXA DE CONCEPÇÃO E PERDA GESTACIONAL DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* NA RAÇA GIROLANDO

(Factors influencing the conception rate and pregnancy loss in Girolando embryos produced in vitro)

Melissa Defensor LOBATO^{1*}; Flávio Luiz Alves MARQUES²; Mayara Mafra SOARES¹; Ana Cláudia Fagundes FARIA¹; Gustavo Pereira CADIMA¹; Ricarda Maria dos SANTOS¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Campus Glória - Bloco 2D. BR 050- Km 78. CEP: 38.410-337; ²Médico Veterinário Autônomo. *E-mail: melissa_defensor@yahoo.com.br

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões é de fundamental importância para a pecuária, entretanto ainda é uma biotecnologia com resultados variados sendo, portanto, necessário estudar formas de melhorar. Objetivou-se com este trabalho avaliar se a categoria das receptoras, estação do ano e estágio de desenvolvimento embrionário afetam as taxas de concepção e as perdas gestacionais em receptoras de embriões da raça Girolando produzidos *in vitro* e transferidos em tempo fixo (TETF). O experimento foi realizado em uma fazenda leiteira comercial, localizada na região de Uberlândia – MG. Foram avaliadas 1.017 TETF. As receptoras foram divididas em vacas em lactação (n=618), vacas secas (n=44) e novilhas (n=355). As estações do ano foram agrupadas em verão (primavera e verão) e inverno (outono e inverno). Os embriões, todos com qualidade morfológica grau 1, foram agrupados de acordo com seu estágio de desenvolvimento em: Grupo 1 (n=216) - blastocisto inicial (BI) e blastocisto (BL) e Grupo 2 (n=801) - blastocisto expandido (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE). Foi detectado efeito da categoria da receptora na taxa de concepção ($p<0,001$) e na perda de gestação ($p<0,003$). O verão afetou negativamente ($p<0,044$) a taxa de concepção. O Grupo 2 teve mais sucesso na manutenção da gestação ($p<0,025$). Conclui-se que os três fatores avaliados interferem nas taxas de concepção e/ou perda gestacional e devem ser considerados nos programas de transferência de embriões da raça Girolando.

Palavras-chave: TETF; blastocisto; PIVE; bovino; prenhez.

ABSTRACT

The *in vitro* production of embryos is fundamental importance for livestock, although it is still a biotechnology with varied results than expected, being therefore necessary study ways to improve its rates. The objective of this study was to evaluate if the recipient category, season and stage of embryo development affect conception rates and gestational losses in recipients of girolando's embryos produced *in vitro* and transferred at fixed time (ETFT). The experiment was carried out in a commercial dairy farm, located in the Uberlândia - MG region. A total of 1,017 TETF were evaluated. The recipients were divided into lactating cows (n=618), dry cows (n=44) and heifers (n=355). The seasons

were grouped in summer (spring and summer) and winter (autumn and winter). The embryos were grouped in Group 1 (n=216) - initial blastocyst (BI) and blastocyst (BL) and Group 2 (n=801) - expanded blastocyst (BX), hatching blastocyst (BH) and hatched (BE). Receptor category effect was detected at conception rate ($p<0.001$) and loss of gestation ($p<0.003$). The summer affected negatively ($p<0.044$) the conception rate. Group 2 was more successful in maintaining gestation ($p<0.025$). It is concluded that the three evaluated factors interfere in conception rates and / or gestational loss and should be considered in the genetic improvement programs embryo transfer of the Girolando breed.

Key words: ETFT, blastocyst, IVP, bovine, pregnancy.

INTRODUÇÃO

O agronegócio é o setor que mais contribui para o crescimento da economia do Brasil, e sozinho é responsável por 25 por cento do produto interno bruto (PIB) do país (MAPA, 2019). A crescente ascensão e produtividade da pecuária brasileira se devem muito aos avanços tecnológicos na reprodução animal e no melhoramento genético do rebanho (VIEIRA, 2014).

A produção *in vitro* de embriões é uma tecnologia muito utilizada na pecuária brasileira com o objetivo de acelerar a produção de animais de alto valor genético, impedir o descarte de fêmeas geneticamente superiores e manter linhagens e raças importantes. (GONÇALVES *et al.*, 2008). No cenário mundial, o Brasil é um dos maiores produtores de embriões *in vitro* (PIVE), sendo responsável por grande parte da produção no mundo (IETS, 2016).

Apesar da grande importância da transferência de embriões no mundo, com mais de 500 milhões de embriões transferidos todo ano, há ainda grandes variações nos resultados da técnica, que é uma grande limitação na sua utilização (BÓ *et al.*, 2002). O manual IETS afirma que mudanças nas condições ambientais e também da qualidade das receptoras e dos embriões são alguns dos grandes estraves nos resultados das TE de embriões PIVE (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

Diante da importância da agropecuária no setor econômico do país, da importância do uso de biotecnologias reprodutivas e da instabilidade dos resultados da PIVE, objetivou-se com este trabalho avaliar se a categoria das receptoras da raça Girolando, a estação do ano e o estágio de desenvolvimento embrionário afetam as taxas de concepção (TxC) e as perdas gestacionais (PGest) em receptoras de embriões da raça Girolando produzidos *in vitro* e transferidos em tempo fixo (TETF).

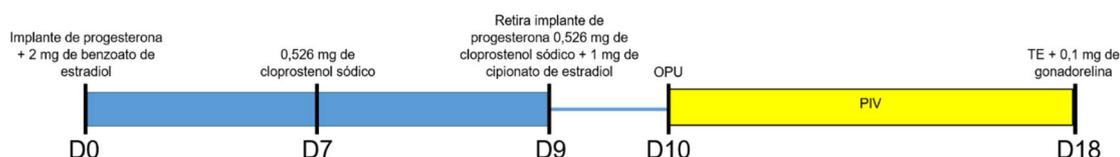
MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número de protocolo 041/14, em uma fazenda comercial produtora de leite, na região de Uberlândia-MG. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, megatérmico, com verões quentes e chuvosos (de outubro a março) e invernos frios e secos (de abril a setembro) (ROSA *et al.*, 1991). A

temperatura média do município variou entre 20,8 e 26,5 °C durante todo o período da realização do estudo.

Para entrarem no programa TETF as receptoras não podiam apresentar nenhum sinal clínico de doença. Além disso, deveriam estar com escore de condição corporal entre 3 e 3,75, numa escala de 1 a 5. No dia 18 da TETF (Fig. 01), as receptoras foram submetidas a um exame de ultrassonografia transretal e eram consideradas aptas ao procedimento de TE somente aquelas que apresentassem pelo menos um corpo lúteo (CL) em um dos ovários. Nessas condições, foram avaliadas 1.017 TETF.

Figura 01: Esquema gráfico do protocolo hormonal e dos procedimentos realizados na TETF.



A composição racial de todas as receptoras e de todos os embriões variava de $\frac{7}{8}$ Holandesa até $\frac{1}{2}$ Holandesa. Já as doadoras de ovócitos variavam desde a raça Gir até a composição racial $\frac{1}{2}$ Holandesa. Todas as doadoras estavam em período de lactação. Os touros utilizados variavam desde a raça Holandês puro até $\frac{5}{8}$ Holandesa.

Foram utilizadas 53 doadoras de ovócitos. Estas não foram submetidas a nenhum protocolo hormonal e seus ovócitos foram colhidos pelo método OPU (Ovum Pick Up) no dia 8 do protocolo de TETF (Fig. 01). Cada doadora tinha um intervalo de descanso de 2 meses entre as aspirações. Com relação ao sêmen, foram utilizados 31 touros diferentes.

Dois médicos veterinários trabalharam durante os processos no campo, um foi responsável por todas as aspirações foliculares e o outro por selecionar e protocolar todas as receptoras, por fazer todas as transferências de embrião (TE), os diagnósticos de gestação (DG) e a confirmação da manutenção da gestação. Todos os embriões foram transferidos a frescos e foram produzidos pelo método PIVE por um único laboratório comercial.

Os embriões foram classificados pelo laboratório de acordo com seu estágio de desenvolvimento (1 a 9) e por sua qualidade morfológica (1 a 4). Para as TE foram usados embriões de qualidade morfológica grau 1 e nos estágios de desenvolvimento 3 (mórula), 4 (blastocisto inicial), 5 (blastocisto), 6 (blastocisto expandido), 7 (blastocisto em eclosão) ou 8 (blastocisto eclodido) (BÓ e MAPLETOFT, 2013). A qualidade morfológica grau 1 caracteriza-se por embriões com massa celular simétrica e esférica, com blastômeros individuais de tamanho, cor e densidade uniformes, a massa embrionária é no mínimo 85% intacta e a zona pelúcida é regular e lisa. Ademais, o estágio do embrião precisa coincidir com sua idade (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

As receptoras foram divididas em categorias, vacas em lactação (n=618), vacas secas (n=44) e novilhas (n=355). As estações do ano foram agrupadas em verão (primavera e verão) (n=307) e inverno (outono e inverno) (n=710). Os embriões foram agrupados de acordo com seu estágio de desenvolvimento, em Grupo 1 (n=216): blastocisto inicial (BI)

(n=28) e blastocisto (BL) (n=188) e Grupo 2 (n=801): blastocisto expandido (BX) (n=762), blastocisto em eclosão (BN) (n=30) e blastocisto eclodido (BE) (n=9).

O protocolo hormonal utilizado nas receptoras foi: D0: inserção do dispositivo intravaginal de progesterona novo (CIDR[®], Zoetis, São Paulo-SP) e aplicação intramuscular de 2,0 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol[®], Ourofino, Cravinhos-SP); D7: aplicação intramuscular de 0,526 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino, Cravinhos-SP); D9–aplicação intramuscular de 0,526 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino, Cravinhos-SP) + 1 mg de cipionato de estradiol (ECP[®], Zoetis, São Paulo-SP) + retirada do dispositivo intravaginal; D18: TE + aplicação intramuscular de 0,1 mg de gonadorelina (Fertagyl[®], MSD, Cruzeiro-SP) (Fig. 01).

O embrião foi depositado no corno uterino ipsi lateral ao ovário que continha o CL. Todas as transferências foram realizadas de forma aleatória. As receptoras protocoladas foram fechadas no curral e a ordem em que foram colocadas na contenção foi ao acaso, da mesma forma os embriões foram transferidos de acordo com a ordem em que estavam alocados na transportadora de embriões.

O diagnóstico de gestação foi realizado por exame de ultrassonografia transretal 23 dias após as TETF. Depois de 30 dias os animais positivos no primeiro diagnóstico foram reexaminados para confirmar a manutenção da gestação. A taxa de concepção (TxC) foi calculada dividindo o número de animais gestantes na primeira avaliação pelo número total de TE. A taxa de perda gestacional (PGest) foi calculada dividindo o número de animais vazios no segundo diagnóstico pelo número de gestantes no primeiro diagnóstico.

Os dados foram analisados por regressão logística no programa MINITAB, sendo incluídos no modelo os efeitos da categoria da receptora e do embrião, de categoria da receptora, estação do ano e estágio de desenvolvimento do embrião, bem como suas interações. Como não foram detectados efeitos da composição genética da receptora e do embrião, bem como das possíveis interações, essas variáveis e as interações foram retiradas do modelo final. A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$, e tendência estatística em $0,05 < p \leq 0,10$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A categoria do animal influenciou a TxC ($p=0,001$) e a PGest ($p=0,003$). Novilhas tiveram TxC de 37,80%, enquanto as vacas secas tiveram taxa de 31,25% e as vacas em lactação, 22,42% (Tab. 01). Resultados estes que corroboram com o trabalho de Hasler (2001) que observou que a TxC foi maior em novilhas de leite e corte, comparando com as vacas de leite. Segundo o autor, essa diferença encontrada pode ser explicada por que vacas de leite sofrem um estresse maior durante a lactação, o que pode comprometer a TxC. Mc Millan (1998) avaliando a influência da receptora manutenção da gestação até os 60 dias, conclui que o ambiente uterino é o fator de interferência dominante no desenvolvimento embrionário precoce, pois proporciona melhores condições para a implantação e para o crescimento embrionário inicial. Uma das diferenças do meio uterino, entre vacas e novilhas, é a concentração do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), importante contribuinte para o desenvolvimento do embrião. Novilhas no

momento do estro e no início da fase lútea possuem altas concentrações de IGF-I, já as vacas têm menor concentração circulante do mesmo (SWANGCHAN-UTHAI *et al.*, 2011).

Tabela 01: Efeito da categoria animal, da estação do ano e do estágio de desenvolvimento do embrião sobre as taxas de concepção e de perda gestacional de embriões produzidos *in vitro*, de fêmeas bovinas leiteiras da raça Girolando mantidas na região de Uberlândia-MG.

Variável	Taxa de concepção 23 dias pós TE	Taxa de perda gestacional*
Categoria Animal (n)		
Novilhas (355)	37,80%	9,15%
Vacas lactação (618)	22,42%	20,77%
Vacas secas (44)	31,25%	20,00%
Valor de P	0,001	0,003
Estação do Ano (n)		
Verão (307)	33,22%	10,89%
Inverno (710)	40,42%	17,54%
Valor de P	0,044	0,061
Estádio Embrião (n)		
Grupo 1** (216)	34,72%	24,32%
Grupo 2*** (801)	39,20%	13,78%
Valor de P	0,229	0,025

*Os animais foram reexaminados 30 dias após o diagnóstico de gestação; **Estágios de desenvolvimento: blastocisto inicial e blastocisto; ***Estágios de desenvolvimento: blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido.

Além das variações no meio uterino, o desempenho reprodutivo de vacas lactantes sofre influência da lactação e do pico de produção de leite que são altamente desfavoráveis para a fertilidade, pois diminuem a TxC e aumentam a ocorrência de serviços repetidos (TIEZZI *et al.*, 2012). Em um experimento, Wolfenson *et al.* (2004) concluíram que as concentrações de estradiol durante o estro, o pico de LH pré-ovulatório e a concentração de progesterona do dia 3 ao 16 do ciclo estral foram maiores em novilhas do que nas vacas em lactação.

As novilhas apresentaram porcentagem menor de PGest (9,15%) do que vacas secas (20,00%) e em lactação (20,77%) (Tab. 01). Resultados semelhantes para PGest já foram relatados por Scanaves *et al.* (2013), que encontraram PGest de 9,75%, em novilhas. Porém, Galli *et al.* (2001) encontraram PGest de 11,1% em vacas Holandesas.

A época do ano também influenciou as TxC ($p=0,044$). No verão a TxC foi menor do que no inverno (Tab. 01). A influência negativa do verão na TxC de receptoras de embrião também foi reportada por Hasler *et al.* (1987). Altas temperaturas podem causar estresse térmico ao animal, que pode acarretar ineficiência da reprodução (TORRES Jr *et al.*, 2008) levando a problemas como: diminuição da qualidade do ovócito da doadora, diminuindo a viabilidade do embrião (LONERGAN e FAIR, 2008), alterações no desenvolvimento folicular e na dinâmica folicular (WOLFENSONET *et al.*, 1995), que pode acarretar na formação de um CL menos capaz de manter a gestação (LOONEY *et al.*, 2016) e alterações do ambiente uterino, que interrompe o desenvolvimento embrionário e resulta na morte do embrião (HANSEN, 2002).

Houve uma tendência ($p=0,061$) de a estação do ano interferir na PGest (Tab. 01). A PGest maior no inverno pode ser consequência de vários outros fatores além do clima, como por exemplo mudanças na nutrição e no manejo, fatores não controlados neste estudo. Assim sendo, os dados coletados para o trabalho em questão são insuficientes para justificar tal correlação. Outro estudo faz-se necessário para avaliar as possíveis causas envolvidas nessa tendência. Em contrapartida Silva (2010) não encontrou interferência da estação do ano na taxa de PGest após a TETF.

Os embriões do Grupo 1 e do Grupo 2 resultaram em taxas de concepção semelhantes ($p=0,229$). Porém, embriões mais jovens (BI e BL) tiveram taxas de PGest maiores ($p=0,025$; Tab. 01) do que os embriões mais desenvolvidos (BX, BN e BE). Hasler (2001) em um estudo com 5070 transferências de embriões produzidos *in vitro* concluiu também que diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, todos com qualidade morfológica grau 1 e com sete dias de idade, não afetaram a TxC ($p>0,05$).

Resultados controversos foram encontrados por outros autores. Scanavez *et al.* (2013), não observaram correlação do grau de desenvolvimento do embrião com a TxC e com a PGest. Veloso Neto *et al.* (2014) e Dantas *et al.* (2018), encontraram resultados diferentes, onde o grupo com embriões em estágio de desenvolvimento inicial (mórula, blastocisto inicial) apresentaram TxC inferior ao grupo com embriões em estágio avançado (blastocisto, blastocisto expandido). Segundo Veloso Neto *et al.* (2014), estes resultados podem ter sido devidos a alterações bioquímicas ou metabólicas que atrasaram o desenvolvimento.

A diferença exercida pelos estágios de desenvolvimento dos embriões sobre a PGest pode ser justificada pelo fato de que alguns embriões apresentam desenvolvimento mais acelerado que outros, pois todos os embriões foram transferidos com a mesma idade, mas estavam em estádios distintos. O desenvolvimento acelerado indica que os embriões em estágio mais avançado são metabolicamente mais competentes e apresentam qualidade superior, que favorece a manutenção da gestação (LOONEY *et al.*, 2016).

As divergências encontradas entre os resultados do presente estudo e dos autores citados pode ser explicada por dados de Vasconcelos *et al.* (2006), que reportaram que a categoria da vaca doadora (lactação ou seca) interfere na qualidade do embrião, uma vez que vacas em lactação produzem leite e sofrem mais com os efeitos do estresse térmico. Nesse estudo todas as doadoras estavam em lactação e nos estudos citados não há informação sobre a categoria das doadoras.

CONCLUSÕES

Para se obter melhores resultados nos programas de transferência de embriões produzidos *in vitro* na raça girolanda deve-se priorizar o uso de novilhas como receptoras e embriões em estágio de desenvolvimento mais avançado, concentrado as transferências no período do inverno

REFERÊNCIAS

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

BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, p.168-173, 2013. Acesso em: 15 de julho de 2019. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p344-348%20\(AR628\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p344-348%20(AR628).pdf).

DANTAS, K.S.A.; CAMPELLO, C.C.; DANTAS, R.A.A.; NUNES, J.F. Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no Nordeste do Brasil. *Ciência Animal*, v.28, n.1, 2018.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed., Roca, São Paulo, 2008. 628p.

HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *Journal of Animal Science*, v.80, n.2, p.33-44, 2002.

HASLER, F.J. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, v.76, n.3, p.52-74, 1998.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1401-14-15, 2001.

HASLER, J.F.; MC CAULEY, A.D.; LATHROP, W.F.; FOOTE, R.H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.27, p.139-168, 1987.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS, 3ª ed., Illinois, p.112-113, 1998.

IETS - The International Embryo Transfer Society. Statistics of embryo collection and transfer on domestic farm. Austrália, 2016. Acesso em: 15 de julho de 2019. Disponível em: https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.

LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H.J.; FORREST, D.W. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v.65, p.201-209, 2016.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A agropecuária brasileira contribui para o fortalecimento da nossa economia. Acesso em: 15 de julho de 2019. Acesso em: 15 de julho de 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agromais/agropecuaria-brasileira.html>

ROSA, R.; LIMA, S.C.; ASSUNÇÃO, W.L. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). *Sociedade & Natureza*, v.3, n.5, p.91-108, 1991.

SCANAVES, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.3, p.722-728, 2013.

SILVA, L.A. Taxa de gestação e mortalidade embrionária em receptoras de embriões produzidos *in vitro*, após sincronização do estro com diferentes protocolos hormonais [dissertação]. Belo Horizonte (Pós-graduação em Ciências Animal), Universidade Federal de Minas Gerais; 2010. 64p. Acesso em: 15 de julho de 2019. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-9HDJDA/leandro_disserta_o.pdf?sequence=1.

SWANGCHAN-UTHAI, T.; WALSH, S.W.; ALEXANDER, S.L.H.; CHENG, Z.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.O.; WATHES, D.C. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. *Reproduction*, v.142, p.457-465, 2011.

TIEZZI, F.; MALTECCA C.; CECCHINATO, A.; PE NASA, M.; BITTANTE, G. Genetic parameters for fertility of dairy heifers and cows at different parities and relationships with production traits in first lactation. *Journal of Dairy Science*, v.95, p. 7355-7362, 2012.

TORRES Jr, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANNA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.69, p.155-166, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M.; DEMETRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; CHIARI, J.R.; RODRIGUES, C.A.; SÁ FILHO, O.G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, v.65, P.192-200, 2006.

VELOSO NETO, H.F.; SILVA, J.C.F.; PEREIRA, L.C.; ANDRADE, J.C.O.; MOURA, M.T.; BARTOLOMEU, C.C.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez e receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro*. *Medicina Veterinária, Recife*, v.8, n.3, p.31-35, 2014.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; MENDANHA, M.F.; SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; SOUZA, A.H.; SANTOS, J.E.O.; BARUSELLI, P.S. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, v.82, p.204-2012, 2014.

WOLFENSON, D.; THACHER, W.W.; BANDIGA, L.; SAVIO, J.D.; MEIDAN, R.; LEW, B.J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, v.52, p.1106-1113, 1995.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1-42-1055, 2004.