

# Produção *in Vitro* de Embrião nas Estações Seca e Chuvosa

## *In Vitro Embryo Production in dry and Wet Seasons*

Izabelle Pereira de Lacerda<sup>\*a</sup>; José de Oliveira Carvalho Neto<sup>b</sup>; Alvaír Hoffmann<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculdade Anhanguera de Ipatinga. MG, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Espírito Santo. ES, Brasil.

<sup>c</sup>Faculdades Associadas de Uberaba. MG, Brasil.

\*E-mail: [izabellelacerda@hotmail.com](mailto:izabellelacerda@hotmail.com)

---

### Resumo

A população mundial tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, por isso, é necessário o aumento na produção de alimento para abastecimento da mesma. O emprego de biotecnologias reprodutivas objetivando multiplicação de animais geneticamente superiores é essencial para otimizar a produção animal, uma vez que se tem animais mais produtivos. Contudo, a estacionalidade das chuvas em países de clima tropical como o Brasil pode comprometer o sucesso dessas biotecnologias. Assim, o objetivo com este trabalho foi avaliar os resultados da produção *in vitro* de embriões durante as estações chuvosa (meses de Janeiro a Março) e seca (meses de Julho a Setembro). Para tanto, fêmeas bovinas da raça Gir (n=15) foram submetidas a aspiração folicular durante ambas estações e avaliados a recuperação ovocitária, a produção embrionária e taxa de concepção, além do desenvolvimento embrionário para cada estação. Maior média (4,5 ± 0,5 vs. 3,08 ± 0,3) e taxa de embrião (51,02 vs. 38,64) foram observados na estação chuvosa em relação a seca (p<0,05). Contudo, a recuperação ovocitária e taxa de concepção não foram afetados pela estação do ano. Conclui-se que a estação do ano compromete diretamente os resultados da produção *in vitro* de embriões, sendo essencial buscar alternativas para minimizar este efeito.

**Palavras-chave:** Bovino. Nutrição. Prenhez.

### Abstract

*With the growing world population, food production must be increased. Thus, reproductive biotechnologies must be used to produce genetically superior animals and optimize animal production. However, the success of such biotechnologies can be compromised by seasonality. This study was performed to evaluate in vitro embryo production (IVEP) in wet (January–March) and dry (July–September) seasons. Gir females (n = 15) were subjected to follicular aspiration in both seasons. Their oocyte recovery, embryo production, pregnancy, and embryo development in each season were evaluated. The mean (4.5 ± 0.5 vs. 3.08 ± 0.3) and embryo rate (51.02 vs. 38.64) in the wet season were higher than those in the dry season (p < 0.05). However, oocyte recovery and pregnancy rate were unaffected by the season. Therefore, seasonality directly compromises IVEP results.*

**Keywords:** Cattle. Nutrition. Pregnancy.

---

## 1 Introdução

A população mundial cresceu nos últimos anos e existe previsão de que aumente em dois bilhões até 2050 (FAO, 2021). Assim, o abastecimento alimentar é uma preocupação das organizações mundiais e o Brasil apresenta potencial de ser o grande fornecedor de alimentos do futuro (PAOLINELLI, 2020). Para isso, é preciso buscar otimizar a produtividade dos animais, buscando maior eficiência nas cadeias de produção.

Para auxiliar neste processo, biotecnologias reprodutivas podem ser empregadas com o intuito de multiplicar animais de maior genética. Dentre as biotecnologias reprodutivas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresenta destaque, uma vez que permite obter maior número de descendentes por fêmea em um mesmo período se comparada à inseminação artificial ou transferência de embriões convencional (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Contudo, a sazonalidade pode ser um fator limitante para

o agronegócio. A maior parte do território brasileiro apresenta características tropicais, caracterizado por inverno frio e seco, e verão quente e chuvoso. Estas características podem afetar a pecuária de diversas maneiras, em especial no que diz respeito a nutrição animal. Isto porque a estação seca/fria pode proporcionar forrageiras de menor qualidade com menor fornecimentos de nutrientes, devido à baixa umidade no solo, baixas temperaturas e fotoperíodo reduzido (LIU et al., 2018; PETERSON; SHEAFFER; HALL, 1992; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS et al., 2004; VITOR et al., 2009).

Com o suprimento nutricional prejudicado, há alteração na concentração circulante de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e dos principais hormônios reprodutivos como hormônio luteinizante, estradiol e progesterona (BUTLER, 2000; SARTORI et al., 2016) comprometendo a fertilidade dos animais e gerando perdas econômicas ao produtor (ROCHE et al., 2011).

Comparando resultados da produção *in vitro* de embriões de um laboratório comercial, Lacerda e colaboradores (dados não publicados) observaram que durante o inverno há maior porcentagem de corpo lúteo de menor área em receptoras de embrião. Sendo que este parâmetro está diretamente relacionado com uma menor taxa de prenhez (LACERDA et al., 2020).

O efeito da sazonalidade também pode ser observado na produção de blastocistos, sendo a produção de blastocisto menor, e com blastocistos de pior qualidade durante estação de inverno, onde há baixa precipitação mensal CHEUQUEMÁN et al., 2016; CHRENEK et al., 2015)

Logo, no contexto da produção *in vitro* de embriões, tanto as fêmeas doadoras podem ser prejudicadas, no que diz respeito à qualidade ovocitária, quanto as receptoras, uma vez que podem apresentar um corpo lúteo de menor volume e menor produção de progesterona, comprometendo a prenhez.

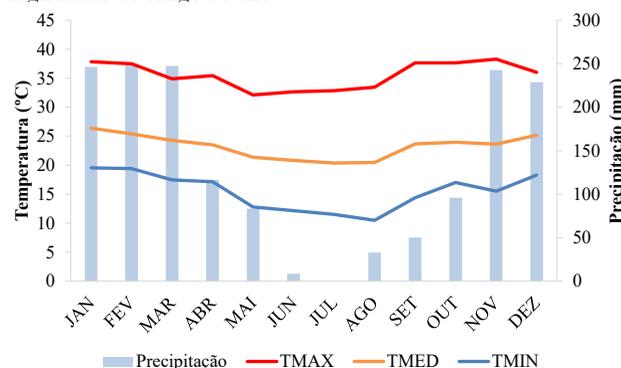
Assim, o objetivo com este trabalho foi avaliar os resultados da produção *in vitro* de embriões durante as estações chuvosa (Janeiro a Março) e seca (Julho a Setembro).

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Localização

O experimento foi realizado em uma propriedade comercial, situada no município de Barão de Monte Alto, na região da zona da mata de Minas Gerais, com clima predominante o tropical, caracterizado por inverno seco e verão chuvoso. As temperaturas mínima, média e máxima e precipitação registradas para região (Figura 1) durante o verão e inverno dos anos 2019 e 2020 foram registrados pela estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizadas em latitude e longitude de -21.104867 e -42.375904, respectivamente.

**Figura 1** – Precipitação e temperaturas máxima média e mínimas registradas ao longo do ano



Fonte: dados da pesquisa.

### 2.2 Produção *in vitro* de embriões

Em um dia aleatório do ciclo estral, fêmeas da raça Gir (n=15), não lactantes e não gestantes, com escore de condição corporal 3,0 (escala de 1,0 a 5,0) foram submetidas a aspiração folicular pelo método de ovun pick up (MONTEIRO et al.,

2017), onde folículos com diâmetro maior que 2 mm foram aspirados com auxílio de aparelho de ultrasson de modo B em tempo real acoplado à um transdutor convexo de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Shenzhen, China). A punção folicular foi realizada utilizando agulha hipodérmica descartável de calibre 19x12 mm conectada a um tubo cônico de 50 mL, contendo solução tampão fosfato salina (PBS) e heparina aquecidos à 37°C. A OPU foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil) com pressão negativa de 90 mmHg. Após OPU, os oócitos recuperados foram rastreados e classificados em estereomicroscópio (Coliman, Santo André, Brasil). Para classificação da qualidade do complexo cumulus-oócito (COCs), foi considerado o aspecto do citoplastama e número de células do cumulus (STOJKOVIC et al., 2001). Os COCs foram classificados em graus 1, 2, 3 e 4, sendo os de graus 1, 2 e 3 submetidos à maturação *in vitro*.

Para maturação, os COCs selecionados foram acondicionados em criotubos contendo meio de maturação recoberto com óleo mineral e transportados para o laboratório em incubadora portátil (WTA, Cravinhos, Brasil) a 39 °C. No laboratório, criotubos contendo os COCs foram transferidos para incubadora a 39°C com saturação de 5% de CO2 em ar até completarem 22 horas de maturação *in vitro* (MIV).

Após a MIV, COCs e espermatozoides foram co-incubados por 18 horas a 39 °C em 5% de CO2 em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o dia zero (D0). Para fecundação *in vitro* (FIV), foi utilizado sêmen sexado contendo cromossomo X de touros utilizados na rotina do laboratório. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C, e posteriormente centrifugado em gradiente de Percoll 90% e 45% para seleção espermática. Após centrifugação, o pellet foi lavado em meio sp-TALP (PARRISH et al., 1995). O pellet obtido após a lavagem, foi ressuscitado em meio de fecundação, suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina. O volume de meio de fecundação contendo os espermatozoides foi calculado de forma a se obter uma concentração final da gota de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram transferidos para gotas de fluido sintético do oviduto suplementado com aminoácidos, citrato e inositol [SOFaaci; (HOLM et al., 1999)], acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB), e cultivados a 39°C em 5% de CO2 em ar por 7 dias (D7). Em D7, os embriões foram avaliados de acordo com o grau de desenvolvimento, seguido de envase em palhetas de 0,25 mL e conduzidos em transportadora portátil (WTA, Cravinhos, Brasil) a 38,5 °C até o local da inovulação.

Os embriões foram transferidos para receptoras cujo estro foi previamente sincronizado. Como receptoras, foram utilizadas novilhas e vacas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5. Em dia aleatório do ciclo estral, as receptoras selecionadas foram submetidas a um protocolo de sincronização hormonal a base

de progesterona e benzoato de estradiol, de modo que o estro ocorresse no mesmo dia da fecundação (D0). No momento da transferência dos embriões, todas as receptoras foram avaliadas com aparelho de ultrassonografia (Mindray DP 2200, Shenzhen, China), sendo consideradas aptas a receber um embrião, receptoras que apresentavam corpo lúteo em um dos ovários. Após avaliação, os embriões foram transferidos para o corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo. Aos 60 dias de gestação (D60) foi realizado o diagnóstico de gestação e sexagem fetal por ultrassonografia.

### 2.3 Nutrição

As doadoras eram submetidas a pastejo extensivo de *Brachiaria humidicola* e suplementadas com 150g de fubá e 135g de mineral reprodução tanto no período seco quanto no período chuvoso.

Durante a estação chuvosa, as receptoras são submetidas a pastejo rotacionado adubado e corrigido com ureia com ajuste para alta lotação e 5kg de concentrado (22%PB e 80%NDT).

Durante a estação seca, as receptoras permanecem no pastejo rotacionado e além da suplementação com 5 kg de concentrado é fornecido também 20kg de Silagem de capim Capiaçu (35%MS, 7%PB e 58%NDT) e 10kg de Cana picada (30%MS, 2%PB e 68%NDT) corrigida com 1% de ureia.

Para a produção do concentrado, 65% de fubá úmido (35%MS) são misturados a 35% de uma pré-mistura cuja composição está descrita no Quadro 1. Resumidamente, para o preparo do fubá úmido o milho é moído em peneira grossa e ensilado com acréscimo de 35% de água e inoculante com *Bacilo plantarum*.

**Quadro 1** – Composição da pré-mistura

Ingredientes	MN (kg)	MS (%)
Farelo de soja	500	90
Mineral Milk	80	100
Ureia	30	99
Mineral Reprodução	12,5	100

Fonte: dados da pesquisa.

A composição dos minerais Milk e Reprodução está descrita na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição dos minerais Milk e Reprodução.

Níveis de garantia	Mineral reprodução	Mineral milk
Cálcio (max)	220g	270g
Cálcio (min)	180g	250g
Cobalto (min)	100mg	50mg
Enxofre (min)	12g	20g
Fósforo (min)	90g	50g
Magnésio (min)	10g	-
Selênio (min)	40mg	20mg
Zinco	6000mg	2000mg
Cobre (min)	1800mg	1000mg
Flúor (max)	988mg	500mg
Iodo (min)	200mg	100mg
Manganês (min)	3000mg	1000mg

Sódio (min)	85g	31g
Monensina Sódica	-	600mg
BHT (min)	-	100mg
Vitamina A (min)	-	200000UI
Vitamina E (min)	-	1000UI
Vitamina D3 (min)	-	40000 UI

Fonte: dados da pesquisa.

### 2.4 Análise estatística

Para avaliar o efeito da dieta oferecida durante as estações seca ou chuvosa na recuperação ovocitária, produção de embrião e taxa de prenhez, foi utilizado o teste de U de Mann-Whitney. Para avaliação se há diferença na proporção do sexo do feto (macho ou fêmea) ou no estágio de desenvolvimento do embrião (blastocisto ou blastocisto expandido), foi utilizado o teste de qui-quadrado. O nível de significância foi de 5% para todos os testes.

### 3 Resultados e Discussão

Neste trabalho foram levantados dados referentes a produção *in vitro* de embriões nas estações seca e chuvosa em uma propriedade leiteira localizada na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais.

Houve efeito da estação do ano sobre a produção de embriões, sendo observado uma diferença tanto na média ( $p=0,009$ ), quanto na porcentagem de embriões produzidos ( $p=0,05$ ), sendo estes parâmetros maiores na estação chuvosa em relação à seca. Contudo, a recuperação ovocitária e prenhez não diferiu ( $p>0,05$ ) entre estações (Quadro 3).

**Quadro 3** – Resultados da produção *in vitro* de embriões de doadoras Gir durante as estações seca e chuvosa.

		Estação		p-valor
		Chuvosa	Seca	
Ovócitos viáveis	$\bar{x}$	8,82 <sup>a</sup> ± 0,8	7,97 <sup>a</sup> ± 0,6	0,544
	%	82,58 <sup>a</sup> ± 1,4	79,22 <sup>a</sup> ± 1,3	0,426
Total		10,68 <sup>a</sup> ± 0,9	10,06 <sup>a</sup> ± 0,8	0,709
Embrião	$\bar{x}$	4,5 <sup>a</sup> ± 0,5	3,08 <sup>b</sup> ± 0,3	0,009
	%	51,02 <sup>a</sup> ± 3,3	38,64 <sup>b</sup> ± 3,5	0,023
Prenhez	$\bar{x}$	1,32 <sup>a</sup> ± 0,2	1,12 <sup>a</sup> ± 0,2	0,750
	%	38,3 <sup>a</sup> ± 5,8	40,0 <sup>a</sup> ± 5,2	0,825

<sup>a,b</sup> Diferentes letras sobrescritas na mesma linha diferem pelo teste U de Mann-Whitney ( $p<0,05$ ).

Fonte: dados da pesquisa.

A produção de embriões está diretamente relacionada com a qualidade dos ovócitos utilizados. No presente estudo, embora não tenha sido observada diferença na recuperação ovocitária, a produção embrionária foi menor na estação seca, tanto na média quanto na taxa de embrião produzido. Resultados semelhantes foram observados por Bastidas e Randel (1987) e Oliveira et al. (2013) em animais zebuínos, sendo menor produção embrionária observada no inverno, sem efeito na recuperação ovocitária.

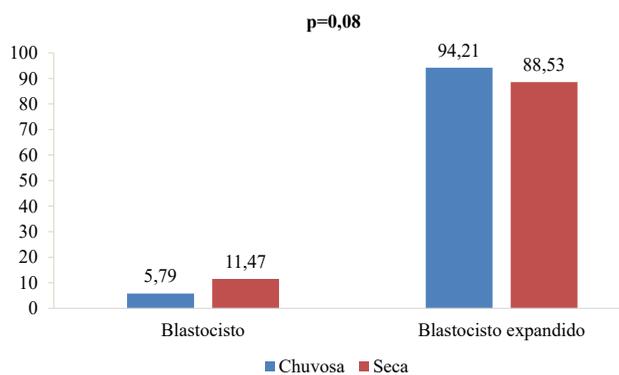
A variação nos resultados da produção *in vitro* de embriões ao longo do ano podem estar relacionados tanto com variações

de temperatura, quanto a qualidade e disponibilidade de alimentos (WATANABE et al., 2018). Durante estação seca/inverno, devido a menor luminosidade, temperatura e chuvas, as pastagens tendem a apresentar pior qualidade e menor fornecimento de nutrientes para os animais (LIU et al., 2018; PETERSON; SHEAFFER; HALL, 1992; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS et al., 2004; VITOR et al., 2009). Além disso, há menor disponibilidade de forragem, associado a menor teor de proteína e aumento na porção fibrosa, o qual pode limitar a ingestão e não suprir adequadamente as exigências nutricionais dos indivíduos (REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS et al., 2004). Considerando que as fêmeas doadoras eram mantidas em regime de pastejo durante todo o ano, estes fatores podem ter afetado negativamente a qualidade ovocitária, resultando em menor produção embrionária.

A taxa de prenhez não foi afetada pela estação do ano. Resultados semelhantes foram observados por Fernandes et al. (2016) em novilhas manejadas em pastejo e com suplementação mineral *ad libitum*. As fêmeas receptoras foram suplementadas durante a estação seca, e, portanto, acreditamos que tenha sido suficiente para manter suas funcionalidades reprodutivas, sem comprometimento nos resultados da IVEP.

Com relação ao desenvolvimento embrionário, foi observada uma tendência ( $p=0,08$ ) de embriões menos desenvolvidos na estação seca (Figura 2).

**Figura 2** – Porcentagem de embriões no estágio de blastocisto e blastocisto expandido nas estações seca e chuvosa

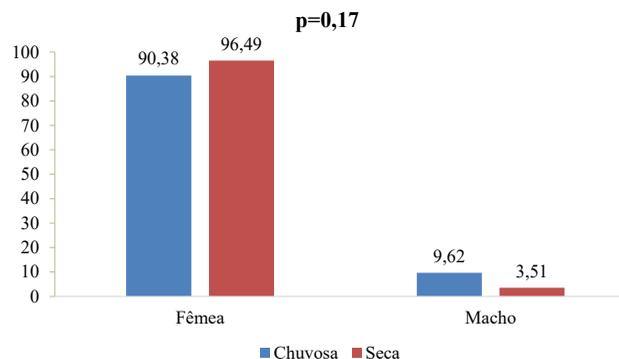


Fonte: dados da pesquisa.

Assim como na produção embrionária, acreditamos que um possível comprometimento na qualidade ovocitária, evidenciado pela menor produção de embriões na estação seca pode também estar relacionada com esta tendência de atraso no desenvolvimento dos embriões nesta estação (ROCHA et al., 1998).

A proporção de machos e fêmeas foi semelhante ( $p>0,05$ ) entre as estações (Figura 3).

**Figura 3** – Porcentagem de machos e fêmeas nas estações seca e chuvosa



Fonte: dados da pesquisa.

Embriões macho e fêmeas apresentam diferenças na resistência a condições de estresse oxidativo (DALLEMAGNE et al., 2018), estresse térmico e também na taxa de crescimento (PÉREZ-CRESPO et al., 2005). Porém, não observamos diferença na proporção de machos e fêmeas nas estações seca e chuvosa, possivelmente por ter sido utilizado sêmen sexado na fecundação *in vitro*.

#### 4 Conclusão

O emprego de biotecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões, é essencial para o melhoramento genético de rebanhos. Contudo, o aporte nutricional adequado para todos os animais envolvidos é essencial para maximizar os resultados desta biotecnologia, sendo necessária atenção especialmente na estação seca do ano.

#### Referências

- ARMSTRONG, D.G. *et al.* Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, v.64, n.6, p. 624-1632, 2001.
- BASTIDAS, P.; RANDEL, R.D. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology*, v.28, n.4, p.531-540, 1987.
- BLONDIN, P. et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.30-38, 2009. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.017
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenol.*, v.55, n.6, p.1323-1340, 2001.
- BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Scie.*, v.60, p.449-457, 2000.
- CAMARGO, A.C. Leite de vacas felizes. *Anuário leite 2018: indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro*. 2018. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2022.
- CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T., Cresce a oferta de leite em tempos de pandemia. *Anuário leite 2021: Saúde única e total*, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Anu%C3%A1rio+do+Leite+2021>>

- /03c94946-5ac0-4d10-4f1c-394a659503e7>. Acesso em: 23 set. 2022.
- CARVALHO, J. O. et al. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.74, n.9, p.1521-1530, 2010.
- CHEUQUEMÁN, C. et al. Decrease in bovine in vitro embryo production efficiency during winter season in a warm-summer Mediterranean climate. *Andrologia*, v.49, n.10, p.e12758, 2017.
- CHRENEK, P. et al. Effect of body condition and season on yield and quality of in vitro produced bovine embryos. *Zygote*, v.23, n.6, p.893-899, 2015.
- DALLEMAGNE, M. et al. Oxidative stress differentially impacts male and female bovine embryos depending on the culture medium and the stress condition. *Theriogenology*, v.117, p.49-56, 2018.
- EUSTÁQUIO FILHO, A. et al. Balanço energético negativo. *Pubvet*, v. 4, p. Art. 780-787, 2010.
- FAO, Forests for food security and nutrition. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/food-security/en/>>. Acesso em: 23 set. 2022.
- FERNANDES, C.A. et al. Weight gain potential affects pregnancy rates in bovine embryo recipients raised under pasture conditions. *Tropical Animal Health Prod.*, v.48, n.1, p.103-107, 2016.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca, 2008.
- GONÇALVES, R.L.R.; VIANA, J.H.M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. *Rev Bras. Reprod. Anim.*, v.43, n.2, p.156-159, 2019.
- LACERDA, I.P. et al. Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. *Livestock Sci.*, v.240, p.104135, 2020.
- LIU, Y. et al. Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. *BMC Plant Biol.*, v.18, n.1, p.13, 2018.
- MACHADO, J.C.; PEREIRA, J.F. Pastagens tropicais: opções de cultivo e os desafios no melhoramento das plantas. *Anuário Leite 2021*. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Anu%C3%A1rio+do+Leite+2021/03c94946-5ac0-4d10-4f1c-394a659503e7>>. Acesso em: 23 set. 2022.
- MONTEIRO, F.M. et al. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, v.90, p.54-58, 2017.
- OLIVEIRA, E.R. et al. Seasonal variation of OPU-IVP results in Zebu donors (*Bos taurus indicus*). In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), *Proceedings*, Praia do Forte, 2013, p. 514.
- PAOLINELLI, A. Brasil é a via mais confiável para segurança alimentar mundial. *Canal Agro*, 2020. Disponível em: <<https://summitagro.estado.com.br/agro-no-brasil/coronistas/brasil-e-a-via-mais-confiavel-para-seguranca-alimentar-mundial/>>. Acesso em: 23 set. 2022.
- PÉREZ-CRESPO, M. et al. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol. Reprod. Develop. Incorpor. Gamete Res.*, v.72, n.4, p.502-510, 2005.
- PETERSON, P.; SHEAFFER, C.; HALL, M. Drought effects on perennial forage legume yield and quality. *Agron. J.*, v.84, n.5, p.774-779, 1992.
- PONTES, J.H.F. et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, v.74, n.8, p.1349-1355, 2010.
- REIS, R.A.; BARBERO, R.A.; HOFFMANN, A. Impacts of forage quality on beef cattle production systems. *Info. Agropec.*, v.37, p.36, 2016.
- RESENDE, J.C. et al., Balança comercial e variações a cada ano. *Anuário leite 2021: Saúde única e total*, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Anu%C3%A1rio+do+Leite+2021/03c94946-5ac0-4d10-4f1c-394a659503e7>>. Acesso em: 23 set. 2022.
- ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos taurus* cows. *Theriogenology*, v. 49, n.3, p.657-665, 1998.
- ROCHE, J.R. et al. Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? *Anim. Produc. Sci.*, v.51, n.12, p.1045-1066, 2011.
- SANTOS, E.D.G. et al. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: 1. Características químico-bromatológicas da forragem durante a seca. *Rev Bras. Zootec.*, v.33, n.1, p.203-213, 2004.
- SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, v.69, n.1, p.88-97, 2008
- SARTORI, R. et al. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.32-40, 2016.
- SIGNORETTI, R.D. et al. Produção e composição de leite de vacas mestiças suplementadas com diferentes níveis de concentrado mantidas em pastagem de capim Tanzânia irrigada. *Bol. Ind. Anim.*, v.70, n.1, p.10-19, 2013.
- STOJKOVIC, M. et al. 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. *Biol. Reprod.*, v.64, n.3, p.904, 2001.
- SUTHAR, V.S.; SHAH, R.G. Bovine In vitro embryo production: an overview. *Vet. World*, v.2, n.12, p.478-479, 2009.
- TEIXEIRA, R.M.A. et al. Suplementação proteica de vacas leiteiras mantidas em pastagem de Tifton 85 durante o período de seca. *Arq. Bras. Medi. Vet. Zootec.*, v.71, p.1027-1036, 2019.
- TRIGAL, B. et al. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v. 78, n. 7, p. 1465-1475, 2012.
- USDA, Dairy: World Markets and Trade. *United States Department of Agriculture*. Disponível em: <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/5t34sj56t/th83mw25f/3f4633036/dairy.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2021
- VIANA, J.H.M. et al. 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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.84, n.1/2, p.1-12, 2004.
- VIANA, J.H.M. et al. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim. Reprod.*, v.9, p.12-18, 2012.

- VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim. Reprod.*, v.14, n.3, p.476-481, 2017.
- VITOR, C.M.T. *et al.* Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim- elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. *Rev. Bras. Zootec.*, v.38, n.3, p.435-442, 2009.
- WATANABE, Y.F. *et al.* Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim. Reprod. (AR)*, v.14, n.3, p.635-644, 2018.
- XU, J. *et al.* Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*, v.89, n.7, p.2510-2518, 2006.
- ZOCCAL, R. Indicadores da produção mundial de leite. *Anuário Leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro*, 2018. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2022.