

ISSN 1806-7093

Outubro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22

Desenvolvimento de embriões produzidos in vitro da Raça Gir e Holandesa criadas em clima tropical

*João Henrique Moreira Viana
Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Wanderlei Ferreira de Sá
Ademir de Moraes Ferreira
Célio de Freitas*

Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 3249-4700

Fax: (32) 3249-4751

Home page: <http://www.cnppl.embrapa.br>

E-mail: sac@cnppl.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Gado de Leite

Presidente: *Pedro Braga Arcuri*

Secretária-Executiva: *Inês Maria Rodrigues*

Membros: *Alexandre Magno Brighenti dos Santos, Aloísio Torres de Campos, Carlos Eugênio Martins, Carlos Renato Tavares de Castro, Edna Froeder Arcuri, Francisco José da Silva Lédo, Jackson Silva e Oliveira, Juliana de Almeida Leite, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Marcelo Dias Müller, Marcelo Henrique Otênio, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, Marlice Teixeira Ribeiro, Wadson Sebastião Duarte da Rocha*

Supervisão editorial, tratamento de ilustrações e editoração eletrônica:

Angela de Fátima Araújo Oliveira

Normalização bibliográfica: *Inês Maria Rodrigues*

Foto da capa: *João Henrique Moreira Viana*

1ª edição

1ª impressão (2007): 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Leite

Desenvolvimento de embriões produzidos in vitro da Raça Gir e Holandesa criadas em clima tropical / João Henrique Moreira Viana... [et al.]. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2007.

16 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa, 22).

ISSN 1806-7093

1. Bovinos leiteiros – reprodução. 2. PIV. 3. Fecundação in vitro. 4. Vacas Gir – oócito. I. Viana, João Henrique Moreira. II. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida. III. Sá, Wanderlei Ferreira de. IV. Ferreira, Ademir de Moraes. V. Freitas, Célio de. VI. Série.

CDD 636.08926

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	8
Material e Métodos	8
Obtenção dos oócitos	8
Maturação e fecundação <i>in vitro</i>	9
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	10
Inovulação dos embriões	10
Análise estatística	10
Resultados	11
Discussão	13
Conclusões	14
Agradecimentos	14
Referências	14

Desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* da Raça Gir e Holandesa criadas em clima tropical

João Henrique Moreira Viana¹
Luiz Sérgio de Almeida Camargo²
Wanderlei Ferreira de Sá³
Ademir de Moraes Ferreira⁴
Célio de Freitas⁵

Resumo

Apesar da importância da raça Gir, pouco se conhece sobre a aplicação da produção *in vitro* de embriões (PIV) nessa raça. Neste trabalho avaliou-se o potencial de desenvolvimento *in vitro* de oócitos de vacas da raça Gir em condições climáticas tropicais e o efeito da técnica de PIV sobre algumas características da gestação e do recém-nascido. As taxas de clivagem e de blastocistos foram maiores ($P < 0,05$) para a raça Gir (66,7% vs. 53,1% de clivados e de 19,6% vs. 10,8% de blastocistos para as raças Gir e Holandesa, respectivamente), porém sem alterar as taxas de gestação, nascimento e perda fetal. Esses resultados sugerem que oócitos de vacas Gir obtidos em condições tropicais possuem maior potencial em desenvolver *in vitro* até estágio de blastocistos, comparado aos da raça Holandesa.

Palavras-chave: oócito, raça Gir, fecundação *in vitro*, gestação.

¹ Médico-Veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – jhmviaa@cnppl.embrapa.br

² Médico-veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – camargo@cnppl.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – wandefsa@cnppl.embrapa.br

⁴ Médico-veterinário, D.Sc. – Pesquisador aposentado da Embrapa Gado de Leite –

⁵ Médico Veterinário, M.Sc. – Embrapa Gado de Leite – celiof@cnppl.embrapa.br

Development of in vitro-produced embryos from Gyr and Holstein cows raised in tropical environment

João Henrique Moreira Viana¹

Luiz Sérgio de Almeida Camargo²

Wanderlei Ferreira de Sá³

Ademir de Moraes Ferreira⁴

Célio Freitas⁵

Abstract

Zebu dairy cattle (*Bos taurus indicus*), like Gir breed, has been raised in tropical and sub tropical climate due to its high thermotolerance, reflecting in higher reproductive performance than *Bos taurus taurus* cattle. Despite the importance of Gir breed for those regions, little is known about the use of in vitro embryo production (IVP) to generate Gir calves. The aim was to evaluate the developmental competence of Gir oocytes obtained in tropical environment and the effect of IVP on gestation and offspring features. Cleavage and blastocyst rates were greater ($P < 0.05$) in Gyr than Holstein (66.7% vs. 53.1% of cleavage and 19.6% vs. 10.8% of blastocyst, respectively), but the pregnancy, birth rate and fetal loss was similar. Those data suggests that oocytes obtained in tropical environment from Gir cows have greater developmental competence than Holstein oocytes.

Index terms: Oocyte, Gyr cattle, in vitro fertilization, pregnancy.

¹ Médico-Veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – jhmviaa@cnppl.embrapa.br

² Médico-veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – camargo@cnppl.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – wandefsa@cnppl.embrapa.br

⁴ Médico-veterinário, D.Sc. – Pesquisador aposentado da Embrapa Gado de Leite –

⁵ Médico Veterinário, M.Sc. – Embrapa Gado de Leite – celiof@cnppl.embrapa.br

Introdução

Para atender à demanda de produção de leite estimada para os próximos anos, há necessidade de se melhorar a qualidade genética dos animais, com a rápida multiplicação de material genético superior e adaptado as condições do país, além de melhorias no manejo como um todo. Nesse contexto, a raça Gir assume grande importância pela sua rusticidade, suficiente para suportar as condições climáticas tropicais e subtropicais, e por ser a principal raça zebuína explorada para leite. Essa raça também é usada para cruzamento com gado europeu, produzindo vacas mestiças Girolandas, principalmente F1. Há necessidade de se intensificar a seleção das vacas Gir e multiplicar esse material genético melhorado. Para isso a Embrapa Gado de Leite vem conduzindo o Programa nacional de Melhoramento do Gir leiteiro, além de efetuar pesquisas visando melhorar a eficiência nos processos de multiplicação (Transferência de embriões e Produção *in vitro* de embriões), mais especificamente para essa raça. Nos processos estudados, a Produção *in vitro* de embriões (PIV) apresenta maior potencial de multiplicação de material genético do que a Transferência de Embriões (TE), podendo resultar em maior intensidade de seleção e, conseqüentemente, aumento do mérito genético de animais (Nicholas, 1996).

Com o desenvolvimento de técnicas que permitem a punção de folículos em fêmeas vivas, a PIV vem surgindo como uma real alternativa para programas de seleção e multiplicação genética (Galli & Lazzari, 1996). Permite também o aproveitamento de vacas inférteis de alto valor, além de ser fonte de ovócitos e zigotos para a produção de animais clonados e transgênicos (Bracket & Zuelke, 1993). Os trabalhos de PIV têm sido conduzidos quase que exclusivamente em bovinos de origem européia. Seus resultados não podem ser extrapolados totalmente para animais zebuínos, devido às diferenças fisiológicas entre essas subespécies, como na secreção de hormônios (Randel, 1984), sensibilidade a hormônios externos (Munro, 1986), comportamento sexual (Galina, 1995), alguns aspectos ultraestruturais nos ovócitos e embriões (Assey et al., 1994; Visintin et al., 2002) e resistência ao estresse térmico.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção in vitro de embriões a partir de oócitos de vacas Gir criadas em clima tropical, utilizando os resultados obtidos com animais da raça Holandesa com termo de comparação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), Cel. Pacheco, MG, e no Campo Experimental de Santa Mônica (CESM), Valença, RJ. Os reagentes químicos utilizados foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, a menos que indicado.

Obtenção dos oócitos

Utilizaram-se nove doadoras adultas da raça Gir e 13 doadoras da raça Holandesa que apresentavam atividade luteal cíclica e população folicular maior que cinco folículos, avaliadas por meio de exames ultra-sonográficos. Os animais de ambos os grupamentos raciais possuíam entre cinco e dez anos de idade e apresentavam escore da condição corporal entre 3,0 e 4,0 pontos (escala de 1-5). As doadoras Gir foram mantidas a pasto enquanto as Holandesas permaneceram em regime de semiconfinamento, recebendo suplementação concentrada. Ambas as raças permaneceram no CECP cuja latitude, longitude e altitude são 21°35"S, 43°51"W e 435 metros, respectivamente. No período do experimento a temperatura compensada diária (média \pm desvio padrão) foi de $21,8 \pm 2,6^\circ\text{C}$, com temperaturas máxima e mínima de $29,4 \pm 1,5^\circ\text{C}$ e $16,3 \pm 3,4^\circ\text{C}$, respectivamente. A umidade relativa do ar foi de $75,9 \pm 4,9\%$.

As punções foliculares para obtenção dos oócitos foram realizadas com o auxílio de um aparelho de ultra-sonografia equipado com transdutor setorial intravaginal de 5/7,5 MHz (Scanner 100S, Pie Medical, Maastricht, Holanda), e uma guia para punção folicular. Folículos com diâmetro igual ou superior a três mm foram puncionados utilizando-se agulhas de 19G e pressão de vácuo de 80 mmHg. O intervalo entre as sessões de punção folicular, em um mesmo animal, variou de 7 a 14 dias. O número de sessões de punção por animal variou de duas a seis sessões.

O líquido folicular foi recuperado em tubos de 50 ml contendo meio DPBS (Nutricell, Campinas, Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell) e 100 UI de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça). Posteriormente, o material coletado foi lavado em filtro de coleta de embriões (Millipore, Bedford, MA, USA) para a recuperação dos complexos células do *cumulus*-oócitos (CCO). Os CCOs foram transferidos para uma placa de Petri contendo DPBS e 10% SFB, mantidos a 37°C, e avaliados quanto à morfologia em microscópio estereoscópio. CCOs contendo oócitos com citoplasma homogêneo e íntegro e com presença de células do *cumulus* aderidas foram selecionados como viáveis e levados para a maturação *in vitro*. Os CCOs selecionados foram acondicionados em tubos de microcentrífuga, tipo Eppendorf, contendo meio TCM199 acrescido de 25 mM HEPES (Gibco, Rockville, MD, USA) e 10% de SFB, e transportados á temperatura entre 37 e 39°C para o Laboratório de Reprodução, em, aproximadamente, 1 a 3 horas após início das punções foliculares.

Maturação e fecundação *in vitro*

A maturação foi realizada em placa escavada de quatro poços, modelo Nunc, em 400ml de TCM 199 acrescido de 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 20mg/ml de FSH (Pluset, Laboratório Calier, Barcelona, Espanha) e 10% de soro de vaca em cio, em incubadora com 5% de CO₂, 95% de umidade e temperatura de 38,8°C, por um período entre 22 e 24h. Para a fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen congelado de um único touro da raça Holandesa para oócitos de vacas Holandesas ou da raça Gir para oócitos de vacas Gir, ambos com fertilidade *in vitro* semelhante, previamente avaliada por meio da taxa de clivagem em oócitos obtidos em ovários coletados em matadouro. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e os espermatozoides móveis selecionados pelo método de *swim up* em meio TALP (Gordon, 1994) em estufa incubadora com 5% de CO₂ a 38,8°C em ar atmosférico. A fecundação foi realizada em microgotas de 100 a 200ml de FERT-TALP (Gordon, 1994), acrescido de 10 mg/ml de heparina, usando concentração espermática entre 2,0-2,5 x 10⁶ espermatozoides/ml e cobertas com óleo mineral, em estufa incubadora com 5% de CO₂, 95% de umidade e 38,8°C por um período aproximado de 22 h.

Cultivo embrionário *in vitro*

Ao final do período de fecundação *in vitro*, os possíveis zigotos foram co-cultivados com suas células do *cumulus* em microgotas de meio CR2aa (Wilkinson et al., 1996) durante oito dias, em 5% de CO₂, 95% de umidade e 38,8°C em ar. Os oócitos foram cultivados em volume de 50ml sob óleo mineral, e o meio renovado com 72h pós-fecundação. A avaliação da taxa de clivagem e contagem do número de células foi realizada 72h pós-fecundação, e a taxa de blastocisto entre o sétimo e oitavo dia.

Inovulação dos embriões

Blastocistos de graus I e II, segundo a classificação de Lindner & Wrigh (1983), foram lavados 3x em PBS + 0,4% de albumina sérica bovina, envasados em palhetas de 0,25 ml, transportados para o CECF ou CESM, e transferidos para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo de receptoras no sétimo ou oitavo dia do ciclo estral. A taxa de gestação foi avaliada entre o 35° e 50° dia após inovulação, por meio de ultra-sonografia. Como receptoras foram utilizadas novilhas mestiças Holandês x Zebu que apresentavam atividade luteal cíclica, mantidas a pasto com suplementação volumosa no inverno até o momento do parto. A taxa de nascimento foi calculada utilizando os dados de bezerros vivos até 72 horas após o parto em função do número de embriões transferidos.

Análise estatística

Os dados obtidos em cada raça para o número de oócitos viáveis, embriões clivados e produção de blastocistos por sessão de punção foram avaliados por análise de variância utilizando-se SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados de taxa de clivagem, de embriões com 4-8 células e com 9-16 células as 72h pós-fecundação e de taxas de produção de blastocistos, de gestação, de nascimento e de perda fetal foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Os valores são apresentados em porcentagem ou como média ± erro padrão da média (EP). Considerou-se nível de significância de 5% de probabilidade.

Resultados

Não se observou diferença ($P > 0,05$) no número de oócitos viáveis, de embriões clivados e de blastocistos produzidos por sessão de punção entre as raças estudadas (Tabela 1). Para verificar se as taxas de desenvolvimento embrionário também eram semelhantes, analisou-se as taxas de clivagem e de blastocistos entre as raças e se observou maiores percentuais ($P < 0,01$) para a raça Gir (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito da raça da doadora de oócitos sobre o número de estruturas embrionárias produzidas in vitro.

Raça	Nº de sessões	Oócitos viáveis Média \pm EP ³	Clivagem Média \pm EP ³	Blastocistos Média \pm EP ³
Holandesa ¹	24	16,2 \pm 2,0	8,6 \pm 2,1	1,75 \pm 0,5
Amplitude		2-54	0-38	0-8
Gir ²	33	15,3 \pm 1,3	10,2 \pm 1,1	3,0 \pm 0,6
Amplitude		6-32	0-24	0-12

Valores na mesma coluna não diferem ($P > 0,05$).

¹ Holandesa: 13 doadoras; ² Gir: 9 doadoras; ³ EP: erro padrão da média.

Tabela 2. Efeito da raça da doadora de oócitos sobre a taxa de produção in vitro de embriões.

Raça	Nº oócitos	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)
Holandesa	390	207 (53,1) ^a	42 (10,8) ^a
Gir	505	337 (66,7) ^b	99 (19,6) ^b

a,b Valores com diferentes letras superescritas na mesma coluna diferem ($P < 0,01$).

Para avaliar se um possível atraso no desenvolvimento após a primeira clivagem poderia estar envolvido na diferença nas taxas de produção de blastocistos entre as raças, analisaram-se as taxas de produção de embriões com 4-8 células e com 9-16 células com 72 horas pós-fecundação, e a produção de blastocistos, baseados no número total de zigotos clivados.

Verificou-se não haver diferença ($P > 0,05$) na proporção de embriões com 4-8 células e com 9-16 células às 72h. Contudo, maior proporção ($P < 0,01$) de embriões clivados na raça Gir desenvolveram-se até blastocistos (Tabela 3).

Tabela 3. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos após a primeira clivagem nas raças Gir e Holandesa.

Raça	Clivados n	Embriões 72 horas após fecundação n (%)		Blastocistos 7 dias n (%)
		4-8 células	9-16 células	
Holandesa	207	117 (56,5) ^a	62 (29,9) ^a	42 (20,3) ^a
Gir	337	184 (54,6) ^a	112 (33,2) ^a	99 (29,4) ^b

^{a,b} Valores com diferentes letras superescritas, na mesma coluna, diferem ($P < 0,01$).

Quarenta e seis blastocistos produzidos *in vitro* foram transferidos para receptoras com ciclo estral sincronizado com o desenvolvimento embrionário. Embora o número de embriões transferidos da raça Holandesa tenha sido baixo (10 embriões), as taxas de gestação e de nascimento não se diferiram ($P > 0,05$) entre as raças (Fig. 1). As perdas fetais entre diagnóstico de gestação e nascimento foram de 16,6% (1/6) e 12,5% (2/16) para as raças Holandesa e Gir, respectivamente, sem diferença entre ambas ($P > 0,05$).

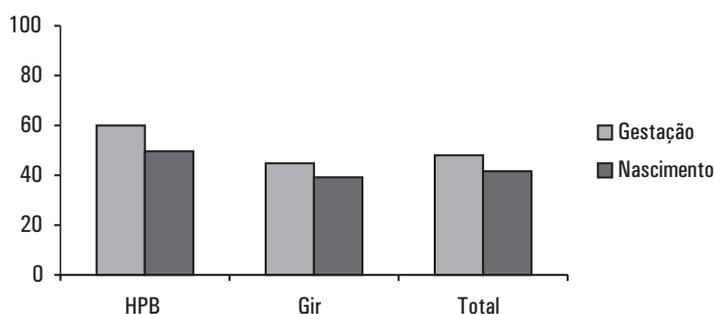


Fig. 1. Taxas de gestação e de nascimento de embriões produzidos *in vitro* das raças Holandesa (HPB – n = 10) e Gir (n = 36), e transferidos à fresco. Valores entre raças não diferem ($P > 0,05$).

Discussão

A raça Gir e seus cruzamentos, tem sido considerada como um dos pilares de sustentação de diversas bacias leiteiras do Brasil, principalmente nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste. O aumento da demanda de animais dessa raça e a necessidade de se acelerar o ganho genético na mesma foram incentivos para o desenvolvimento do presente trabalho.

A presente experimento avaliou o potencial de produção in vitro de embriões na raça Gir (*Bos indicus*), comparando-o com o da Holandesa (*Bos taurus*) criadas em ambientes tropicais, tendo sido verificado que os oócitos de Gir produziram maior taxa de blastocistos, sinalizando uma maior potencialidade de desenvolverem *in vitro*, apesar de ambas as raças produzirem um número relativo de embriões por sessão de punção. Essa observação mostra que existe variação entre raças na produção in vitro de embriões, provavelmente em função da adaptação da sua subespécie ao clima em que se encontra a doadora. Esse efeito parece limitar o desenvolvimento até o estágio de blastocistos, mas não o desenvolvimento posterior, uma vez que as taxas de gestação foram semelhantes entre os dois genótipos avaliados.

Tem-se observado que oócitos de doadoras da raça Holandesa submetidas á condições de estresse térmico natural (verão), apresentam-se com baixo potencial de desenvolvimento *in vitro* (Roth et al., 2001, Al-Katanani et al., 2002). Por outro lado, embriões Brahman fecundados *in vitro* são menos afetados pelo estresse térmico, resultando em maiores taxas de produção de blastocistos do que embriões *Bos taurus* submetidos às mesmas condições de estresse térmico (Paula-Lopes et al., 2003). Não se têm informações se os oócitos zebuínos também possuem maior resistência quando submetidos ao estresse térmico. Contudo, Rocha et al. (1998) observaram que vacas Holandesas na estação quente do ano produziram oócitos de menor qualidade do que vacas Brahman (*Bos indicus*). Embora não se possa afirmar que os animais doadores estiveram sob condições de estresse térmico no presente estudo, os resultados sugerem que as doadoras da raça Gir, em regiões de clima tropical, são capazes de produzir oócitos com melhor potencial de desenvolvimento.

A viabilidade dos embriões de ambas as raças foi avaliada por meio da taxa de gestação e de nascimento. Apesar da menor taxa de blastocistos produzidos na raça Holandesa, a taxa de gestação e de nascimento não foi diferente da raça Gir, indicando que a qualidade dos blastocistos produzidos não foi afetada pelo genótipo das doadoras, nas condições de ambiente deste experimento. Taxa de gestação semelhante tem sido observada em outros trabalhos que utilizaram sistema de cultivo parecido, com soro fetal bovino e transferência de embriões á fresco, variando de 32,8% a 50,4% (Numabe et al., 2000, Hasler et al., 2000, Hoshi, 2003), enquanto as taxas de nascimento têm permanecido em torno de 30%, apesar de existir grande variação entre experimentos (Peterson & Lee, 2003, Smeaton, 2003).

Conclusões

Os resultados do presente experimento mostram que em ambientes tropicais, oócitos da raça Gir possuem maior potencial em desenvolver a blastocistos do que os da raça Holandesa, sugerindo que o genótipo dos oócitos obtidos em condições climáticas subtropicais influencia o sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos. Contudo, uma vez produzido o blastocisto, sua viabilidade torna-se semelhante entre estas raças estudadas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro através do projeto CAG1153/02.

Referências

- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002.
- ASSEY, R. J.; HYTTTEL, P.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Infrequent structures in cattle oocytes. *Anatomy and Embryology*, v. 190, p. 263-271, 1994.

BRACKETT, B. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 39, p. 43-64, 1993.

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Reproductive physiology in zebu cattle, characteristics related to estrous expression and performance of bulls utilized in natural mating. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1995. p. 46-61.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 371-379, 1996.

GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International. London: Cambridge Univ. Press, 1994. 640 p.

HASLER, J. F. *In vitro* culture of bovine embryos in Menezo's B2 medium with or without co-culture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 81-91, 2000.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v. 59, p. 675-685, 2003.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JR., R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v. 20, p. 407-416, 1983.

MUNRO, R. K. The superovulatory response of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle following treatment with follicle stimulating hormone and progesterone. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 91-97, 1986.

NICHOLAS, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 205-214, 1996.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T. et al. Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, v. 54, p. 1409-1420, 2000.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C. JR.; AL-KATANANI, Y. M. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between

breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, v. 125, p. 285-294, 2003.

PETERSON, A. J.; LEE, R. S-F. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, v. 59, p. 687-697, 2003.

RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology*, v. 21, p. 170-185, 1984.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 49, p. 657-665, 1998.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 745-751, 2001.

SMEATON, D. C.; HARRIS, B. L.; XU, Z. Z. et al. Factors affecting commercial application of embryo technologies in New Zealand: a modeling approach. *Theriogenology*, v. 59, p. 617-634, 2003.

VISINTIN, J. A.; MARTINS, J. F. P.; BEVILACQUA, E. M.; MELLO, M. R. B.; NICÁCIO, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different. *Theriogenology*, v. 57, p. 345-359, 2002.

WILKINSON, R. F.; MING, R.; ANDERSON, B. et al. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. *Theriogenology*, v. 45, p. 41-49, 1996.