

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/11/2025.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**VALIDAÇÃO DO TRANSPORTE DE EMBRIÕES BOVINOS EM
CAIXA ISOTÉRMICA**

LUIZ GUSTAVO FERREIRA DE LIMA

Botucatu, SP

Maio – 2025

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**VALIDAÇÃO DO TRANSPORTE DE EMBRIÕES BOVINOS EM
CAIXA ISOTÉRMICA**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de MESTRE.

Aluno: Luiz Gustavo Ferreira de Lima

Orientador: Prof. Dr. João Carlos
Pinheiro Ferreira.

Botucatu, SP

Maio – 2025

L732v Lima, Luiz Gustavo
Validação do transporte de embriões bovinos em caixa isotérmica /
Luiz Gustavo Lima. -- Botucatu, 2025
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

1. Produção in vitro; transporte embrionário; transferência de
embriões; biotecnologia da reprodução.. I. Título.

Autor: Luiz Gustavo Ferreira de Lima

Título: **Validação do transporte de embriões bovinos em caixa isotérmica**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira.

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP -
Botucatu/SP

Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Membro

PPG Ciência animal, FCAV – UNESP, Jaboticabal/SP

Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP -
Botucatu/SP

Data da defesa: 14 de maio de 2025.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me conceder o dom da vida, saúde, sabedoria, e me conceder todos os dias a sua proteção.

A toda a minha família, fonte inesgotável de força. Em especial a minha mãe Vanessa Aparecida Ferreira, pela base ética e por todo o apoio, sacrifício realizado que me permitiu chegar até aqui. Obrigado por ser meu alicerce em todos os momentos, por me incentivar mesmo quando os caminhos pareciam difíceis, por me apoiar silenciosamente e acreditar em mim quando nem eu mesmo tinha certeza. Este trabalho é, acima de tudo, um reflexo do seu esforço, do seu sacrifício e da sua fé. Se hoje chego até aqui, é porque você nunca me deixou desistir. Essa conquista é tão sua quanto minha.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, pela confiança, orientação técnica, e pela liberdade intelectual concedida para explorar este tema. Suas críticas construtivas e expertise na área de reprodução animal foram fundamentais para o aprimoramento desta pesquisa. A prof. Dra. Eunice Oba dedico igual reconhecimento pelo apoio e parceria firmada durante o mestrado.

Aos demais professores que pacientemente compartilharam de seus conhecimentos e experiências ao longo dessa jornada.

A universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal,

direciono meus agradecimentos pela infraestrutura e recursos técnicos oferecidos. Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Não poderia deixar de mencionar os colegas que dedicaram seus dias a auxiliar na produção deste trabalho Thainá Sallum Bacco, Thaisy Tino Dellaqua, Rogério Araújo de Almeida Filho os quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, cujo companheirismo e cumplicidade tornou essa trajetória mais leve e agradável. Em especial a Thainá que além da parceria do trabalho se tornou minha parceira de vida.

Agradeço as empresas BotuPharma e CEOgenetics, meu reconhecimento pela colaboração e apoio quanto aos materiais utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos que me acompanharam durante a trajetória e aqueles que adquiri durante ela, meu carinho em especial. Vocês foram meu porto seguro nos dias de incerteza e minha celebração nas pequenas conquistas.

Por fim, dedico este trabalho a comunidade científica e aos profissionais da pecuária, na esperança de que os resultados aqui apresentados possam de alguma forma contribuir para avanços na pecuária.

RESUMO

LIMA, L. G. F. Validação do transporte de embriões bovinos em caixa isotérmica. Botucatu, 2025, 89p. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – Campos Botucatu.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferência de embriões são biotecnologias amplamente empregadas na reprodução de bovinos, desempenhando papel estratégico no melhoramento genética dos rebanhos e no aumento da eficiência produtiva dos sistemas de cria. Apesar dos avanços significativos nas técnicas de produção *in vitro* e sincronização hormonal, a etapa de transporte dos embriões ainda representa um ponto crítico e pouco explorado na literatura científica, sendo determinante para o sucesso final do procedimento. Este trabalho teve como objetivo reunir, analisar e discutir os principais fatores que afetam a viabilidade embrionária durante o transporte, buscando compreender os desafios logísticos e técnicos que podem comprometer a taxa de sucesso obtida com a técnica. Foram abordados aspectos relacionados aos diferentes métodos de transporte, como o uso de incubadoras portáteis, criopreservação, vitrificação e resfriamento, bem como suas respectivas vantagens e limitações. A temperatura durante o transporte foi destacada como um dos fatores mais críticos, sendo demonstrado que tanto temperaturas excedendo o nível fisiológico quanto temperaturas abaixo do mesmo podem comprometer a integridade celular, influenciar negativamente a eclosão embrionária e consequentemente reduzir as taxas de prenhez. Além da temperatura, o meio utilizado para transporte também exerce papel fundamental na manutenção da viabilidade embrionária, uma vez que fornece substratos

essenciais ao metabolismo e pode atuar como barreira contra o estresse oxidativo. O uso de soluções tamponadas, suplementadas com antioxidantes e proteínas séricas, tem se mostrado eficaz para o transporte de curta e média duração. No entanto, para trajetos mais longos, estratégias como o cultivo sequencial ou sistemas microfluídicos são alternativas promissoras, embora ainda pouco aplicadas em escala comercial. Complementarmente, a tese aborda a importância da seleção criteriosa e da sincronização hormonal das receptoras, fatores decisivos para o sucesso da técnica. A preparação adequada da receptora, incluindo avaliação clínica e ginecológica, bem como a escolha do protocolo hormonal mais adequado à categoria animal e à realidade da propriedade, são fundamentais para otimizar os resultados da TE. Conclui-se que o transporte de embriões, frequentemente negligenciado em muitos programas de PIVE, deve ser tratado como uma etapa estratégica, cuja padronização e aprimoramento técnico podem resultar em ganhos significativos nas taxas de prenhez e na eficiência geral dos programas comerciais de transferência de embriões. A escassez de estudos específicos sobre o tema reforça a necessidade de mais pesquisas aplicadas, com foco na validação de protocolos logísticos e no desenvolvimento de soluções que garantam a estabilidade térmica e metabólica dos embriões durante o deslocamento entre laboratórios e propriedades rurais.

Palavras-chave: *in vitro*; transporte embrionário; transferência de embriões; biotecnologia da reprodução.

ABSTRACT

LIMA, L. G. F. Validation of bovine embryo transport in an isothermal box. Botucatu, 2025, 89p. Master's thesis – São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho (UNESP), FMVZ – Botucatu Campus.

In vitro embryo production and embryo transfer are biotechnologies widely used in bovine reproduction, playing a strategic role in the genetic improvement of herds and in increasing the productive efficiency of cow-calf systems. Despite significant advances in *in vitro* production techniques and hormonal synchronization, the embryo transport stage still represents a critical point that is little explored in the scientific literature, being decisive for the final success of the procedure. This study aimed to compile, analyze, and discuss the main factors that affect embryonic viability during transport, seeking to understand the logistical and technical challenges that may compromise the success rate achieved with the technique. Aspects related to different transport methods were addressed, such as the use of portable incubators, cryopreservation, vitrification, and cooling, as well as their respective advantages and limitations. Temperature during transport was highlighted as one of the most critical factors, with evidence showing that both temperatures exceeding the physiological level and those below it can compromise cellular integrity, negatively influence embryonic hatching, and consequently reduce pregnancy rates. In addition to temperature, the medium used for transport also plays a fundamental role in maintaining embryonic viability, as it provides essential substrates for metabolism and can act as a barrier against oxidative stress. The

use of buffered solutions, supplemented with antioxidants and serum proteins, has proven effective for short and medium-duration transport. However, for longer journeys, strategies such as sequential culture or microfluidic systems are promising alternatives, although still rarely applied on a commercial scale. Additionally, the thesis addresses the importance of careful selection and hormonal synchronization of recipients, which are decisive factors for the success of the technique. The proper preparation of the recipient, including clinical and gynecological evaluation, as well as the selection of the most appropriate hormonal protocol for the animal category and the reality of the farm, are fundamental to optimize the results of embryo transfer. It is concluded that embryo transport, often neglected in many IVP programs, should be treated as a strategic stage, whose standardization and technical improvement can result in significant gains in pregnancy rates and in the overall efficiency of commercial embryo transfer programs. The scarcity of specific studies on the subject reinforces the need for more applied research, focusing on the validation of logistical protocols and the development of solutions that ensure thermal and metabolic stability of embryos during transportation between laboratories and rural properties.

Keywords: *in vitro*; embryo transport; embryo transfer; reproductive biotechnology.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

SIGLAS

CCOs: Complexos cúmulos-oócito

CFA: Contagem de folículos antrais

CIV: Cultivo *in vitro*

CL: Corpo lúteo

ECC: Escore de condição corporal

eCG: Gonadotrofina coriônica equina

FD: Folículo dominante

FIV: Fecundação *in vitro*

FSH: Hormônio folículo estimulante

IA: Inseminação artificial

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

LH: Hormônio luteinizante

MIV: Maturação *in vitro*

OPU: Ovum pick-up

pH: Potencial de hidrogênio

PIVE: Produção *in vitro* de embriões

TE: Transferência de embrião

TETF: Transferência de embrião em tempo fixo

SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius.

%: Porcentagem.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	32
2. REVISÃO DE LITERATURA	34
2.1. Fisiologia reprodutiva da fêmea Bovina	34
2.1.1. Controle hormonal do ciclo estral	35
2.1.2. Dinâmica folicular e seleção do folículo dominante	36
2.1.3. Reserva ovariana e implicações na fertilidade	38
2.2. Reprodução assistida em bovinos	39
2.2.1 Importância da reprodução assistida para o melhoramento genético e produtividade pecuária	39
2.2.2 Papel da transferência de embriões e produção <i>in vitro</i> de embriões na eficiência reprodutiva e produtiva	40
2.3 Aspiração Folicular	41
2.3.1. Fatores que influenciam na qualidade oocitária	43
2.3.2. Critérios de seleção dos complexos cúmulos-oócitos para a PIVE	44
2.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões	47
2.4.1. Maturação <i>In Vitro</i>	49
2.4.2. Fertilização <i>In Vitro</i>	51
2.4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	51
2.5. Transporte de embriões bovinos e fatores críticos	52
2.5.1. Tipos de transporte de embriões bovinos	53
2.5.2. Temperatura para transporte de embriões bovinos	55
2.5.3. Meio de transporte	56
2.5.4. Tempo de duração do transporte	56
2.6. Transferência de embriões	57
2.6.1. Seleção e preparação de receptoras	58
2.6.2. Inovulação	60
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	62
4.1. Hipótese(s)	62
4.2. Objetivo(s) geral(s)	62

4.3. Objetivo(s) específico(s)	63
5. REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 2.....	77
ARTIGO CIENTÍFICO	1
2.1. Ethical aspects	4
2.2. Experimental design	4
2.3. Experiment 1: Validation of the isothermal box	6
2.4.1. Animals.....	8
2.4.2. Follicular aspiration	8
2.4.3. Recovery and selection of cumulus-oocyte complexes.....	9
2.4.4. <i>In vitro</i> maturation.....	9
2.4.5. <i>In vitro</i> fertilization.....	10
2.4.6. <i>In vitro</i> culture	10
2.4.7. Packaging and transport of embryos	11
2.4.8. <i>In vitro</i> assessment of embryos after simulated transport.....	11
2.5. Experiment 3: <i>In vivo</i> viability of bovine embryos following 6-hour simulated transport in the Botuflex® isothermal box.	12
2.5.1. Animals.....	12
2.5.2. Embryo production	12
2.5.3. Packaging and transport of embryos	12
2.5.4. Embryo Transfer	13
2.6. Statistical analysis	14
3. Results.....	15

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pecuária bovina desempenha um papel estratégico na segurança alimentar global, fornecendo carne e leite para uma população em constante crescimento (DAVIS; WHITE, 2020). No entanto, o setor enfrenta desafios como a demanda por maior eficiência produtiva, sustentabilidade ambiental e otimização do melhoramento genético (IDAMOKORO, 2023). Tecnologias reprodutivas avançadas têm sido fundamentais para atender a essas exigências, permitindo maior controle sobre a reprodução e a disseminação de material genético superior. Nesse contexto, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) destaca-se como uma ferramenta essencial para acelerar o ganho genético, aumentar a produtividade e viabilizar a reprodução de animais de alto valor zootécnico.

No entanto, para se obter bons resultados utilizando a PIVE, se faz necessário o controle minucioso de todas as etapas da técnica. Todos os fatores envolvidos no processo, desde a aspiração folicular até a transferência embrionária, desempenham um papel determinante na viabilidade e no potencial gestacional dos embriões (CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008; FERRAZ et al., 2016). Entre esses fatores, as condições de transporte dos embriões até os locais de transferência representam um aspecto crítico, ainda pouco explorado na literatura científica.

A distância percorrida, o tempo utilizado no transporte de embriões e a temperatura utilizada para o transporte desses são pontos potencialmente limitantes à técnica, uma vez que podem impactam diretamente na taxa de sucesso (LOIOLA et al., 2014). O transporte de oócitos é embriões

predominantemente realizado com o auxílio de incubadoras portáteis elétricas automáticas que permitem a manutenção de ovócitos e embriões em ambiente e temperatura ideais desde a maturação inicial até a inovulação nas receptoras (MAX et al., 2012). Apesar de eficazes, essas incubadoras apresentam desafios operacionais significativos, como alto custo de aquisição, necessidade contínua de energia elétrica, fragilidade em ambientes de campo e consequentemente, dificuldades logísticas para uso em larga escala. Em regiões remotas ou em países com infraestrutura limitada, essas restrições assumem um caráter ainda mais limitante, dificultam a disseminação da PIVE. Esse cenário evidencia a necessidade de alternativas de transporte mais acessíveis (CURRIN et al., 2021; SOUZA et al., 2021).

Uma solução promissora para o transporte de embriões é o uso de caixas isotérmicas. Essas caixas, que estão validada e são empregadas para o transporte de uma variedade gametas e materiais biológicos (MALMGREN, 1998; FILHO et al., 2012; CUNHA et al., 2014; CAMARGO et al., 2024; LOPES, 2024), já vêm sendo adotadas empiricamente no transporte de embriões bovinos. Esses sistemas passivos utilizam materiais isolantes térmicos para manter uma temperatura estável ao longo do transporte, dispensando a necessidade de eletricidade e controle eletrônico. Essa modalidade de transporte tem o potencial de simplificar a logística, reduzir custos operacionais e ampliar o acesso à tecnologia PIVE. No entanto, a substituição das incubadoras portáteis por sistemas isotérmicos requer rigorosa validação científica, uma vez que os embriões produzidos por PIVE são particularmente sensíveis a oscilações térmicas, e tempos prolongados de transporte (PUELKER et al., 2010).

Acknowledgements

The authors thank São Paulo State University (Júlio de Mesquita Filho), FMVZ-UNESP Botucatu-SP, for the technical support and infrastructure provided for this study.

We also thank the laboratory team for their assistance during the experiments.

We are grateful to BotuPharma (Botucatu, SP, Brazil) for their support and for providing the production media, which were essential for conducting this study.

Finally, we express our gratitude to the collaborators and reviewers whose suggestions contributed to the improvement of this manuscript.

6. References

- [1] Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2020;14:991–1004.
<https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>.
- [2] Marques De Lima W, Mazzarollo Frata M, Rovani MT, Mondadori RG, Vieira AD, Ferreira R, et al. Current challenges and perspectives of in vivo and in vitro commercial embryo production of taurine and synthetic breeds 2023.
<https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2023.036>.
- [3] Leite RF, Annes K, Ispada J, De Lima CB, Dos Santos ÉC, Fontes PK, et al. Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on in

483 Vitro Produced Embryos. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017.
 484 <https://doi.org/10.1155/2017/1502489>.

485 [4] Motta JCL, Hayden CB, Sala R V., Ross PJ, García-Guerra A. Advances in synchronization
 486 and superstimulation for OPU/IVF: optimizing oocyte quantity and quality. *Reprod*
 487 *Fertil Dev* 2024;37. <https://doi.org/10.1071/RD24143>.

488 [5] Wiltbank M, Garcia-Guerra A, Sala R V, Fosada M, Carrenho-Sala L, Moreno JF. 200
 489 Improving efficiency of embryo transfer (ET) programs by optimizing fertility and
 490 management of recipients. *J Anim Sci* 2019;97:116–7.
 491 <https://doi.org/10.1093/JAS/SKZ122.206>.

492 [6] Santos JEP, Cerri RLA, Sartori R. Nutritional management of the donor cow.
 493 *Theriogenology* 2008;69:88–97.
 494 <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.09.010>.

495 [7] Heyman Y. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in
 496 cattle. *Theriogenology* 1985;23:63–75. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90073-](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90073-1)
 497 [1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90073-1).

498 [8] Max MC, Santos GMG, Melo-Sterza FA, Silva-Santos KC, Morotti F, Basso AC, et al. In
 499 vitro embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo
 500 transport. *Small Ruminant Research* 2012;105:286–9.
 501 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.004>.

502 [9] Aparicio-Ruiz B, Gámiz P, Galán A, Remohí J. Embryo culture conditions under high
 503 humidity significantly enhances blastocysts formation and quality according to an
 504 automatic time-lapse algorithm 2019.

505 [10] Naranjo-Gómez JS, Uribe-García HF, Herrera-Sánchez MP, Lozano-Villegas KJ,
 506 Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Heat stress on cattle embryo: gene
 507 regulation and adaptation. *Heliyon* 2021;7.
 508 [https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06570/ASSET/A6343D3B-51CF-4066-B029-](https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06570/ASSET/A6343D3B-51CF-4066-B029-4B685884200B/MAIN.ASSETS/GR1.JPG)
 509 [4B685884200B/MAIN.ASSETS/GR1.JPG](https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06570/ASSET/A6343D3B-51CF-4066-B029-4B685884200B/MAIN.ASSETS/GR1.JPG).

510 [11] Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to
 511 high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001;121:107–15.
 512 <https://doi.org/10.1530/REP.0.1210107>.

513 [12] Loiola MVG, Chalhoub M, Rodrigues AS, Ferraz PA, Bittencourt RF, Filho A de LR.
 514 Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte
 515 de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Ciencia Animal Brasileira* 2014;15:93–
 516 101. <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.23327>.

517 [13] Cavalieri FLB, Adreazzi MA, Colombo AHB, Emanuelli IP, Moreski DAB, Silva WM.
 518 Estudo sobre o cultivo in vitro de embriões bovinos durante o transporte. *Ars*
 519 *Veterinaria* 2015;31:07–11. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2015V31N1P07-11>.

520 [14] Marinho LSR, Untura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches B V, et al. Large-scale
 521 programs for recipients of in vitro-produced embryos. 2012.

522 [15] Bilton RJ, Moore NW. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand
 523 to Australia. *Reproduction* 1977;50:363–4. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0500363>.

524 [16] Cavichioli Sebastião TR, de Souza Francisquini CD, Mungai Chacur MG. Efeito de meios
525 diluentes e sistemas de transporte no semen congelado analisado pelo método
526 computacional casa em touros nelore. *Colloquium Agrariae* 2018;14:145–50.
527 <https://doi.org/10.5747/CA.2018.V14.N4.A257>.

528 [17] D. Missio . Conservacao-de-foliculos-pre-antrais-de-felinos-domesticos-Felis-catus-
529 refrigerados-por-24-horas-em-TCM-199-e-PBS 2014.

530 [18] Houghton PL, Lemenager RP, Horstman LA, Hendrix KS, Moss GE. Effects of body
531 composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive
532 performance of beef cows and preweaning calf gain. *J Anim Sci* 1990;68:1438–46.
533 <https://doi.org/10.2527/1990.6851438X>.

534 [19] Ferrazza R de A, Garcia HDM, Schmidt EM dos S, Carmichael MM, Souza FF de,
535 Burchmore R, et al. Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during
536 follicle development. *Biol Reprod* 2017;97:835–49.
537 <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX148>.

538 [20] Oliveira CS, Varella R, Carolina S, Romano C, Biotécnicas Q, Reprodução D, et al.
539 Documentos 175 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite
540 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2014.

541 [21] Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MFS, Nasser LFT, Rodrigues CA, Bó GA. Bovine embryo
542 transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod*
543 *Fertil Dev* 2009;22:67–74. <https://doi.org/10.1071/RD09214>.

544 [22] Silva LKX, Reis AN, Silva AOA, Sousa JS, Souza AJO, Vale WG. Transporte de oócitos
545 bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da
546 atmosfera gasosa. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011;63:74–80.
547 <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100012>.

548 [23] Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim*
549 *Reprod Sci* 2003;79:245–64. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00167-2).

550 [24] Leese HJ. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and
551 viability. *BioEssays* 2002;24:845–9.
552 <https://doi.org/10.1002/BIES.10137;SUBPAGE:STRING:ACCESS>.

553 [25] Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis:
554 Molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1345–53.
555 <https://doi.org/10.1002/MRD.20604>.

556 [26] Camargo GS, de Barros LD, Oliveira-Filho JP, Bromberger CR, Dias-Melicio LA, Alves dos
557 Santos L, et al. Evaluation of blastocyst re-expansion, quality in relation to storage
558 temperature, and sexing using blastocoel fluid after manual perforation with a hand-
559 held needle involving in vivo produced equine embryos. *Theriogenology* 2024;219:39–
560 48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.02.012>.

561 [27] Ramos ADA, Polisseni J, De Sá WF, Ferreira ADM, Camargo LSDA, Folhadella DDS, et al.
562 Effect of transportation on development of fresh or vitrified-warmed bovine embryos.
563 *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006;35:2285–9. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000800012>.

- 565 [28] Swain JE. Optimal human embryo culture. *Semin Reprod Med* 2015;33:103–17.
566 <https://doi.org/10.1055/S-0035-1546423/ID/JR00931-22/BIB>.
- 567 [29] Seidel GE., Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle 1991:164.
- 568 [30] Madan ML, Das SK, Palta P. Application of reproductive technology to buffaloes. *Anim*
569 *Reprod Sci* 1996;42:299–306. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01534-5](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01534-5).
- 570 [31] Mapletoft RJ, Hasler JF, Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in
571 cattle: A review Article in *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* · May 2005 Assisted
572 reproductive technologies in cattle: a review. vol. 24. 2005.
- 573 [32] Baruselli PS, Ferreira RM, Vieira LM, Souza AH, Bó GA, Rodrigues CA. Use of embryo
574 transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology* 2020;155:1–11.
575 <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.04.028>.
- 576 [33] Mukunoki A, Takeo T, Nakao S, Tamura K, Horikoshi Y, Nakagata N. Simple transport
577 and cryopreservation of cold-stored mouse embryos. *Exp Anim* 2020;69:423–9.
578 <https://doi.org/10.1538/EXPANIM.20-0042>.

579

580