

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).

Diante de um cenário global que demanda maior sustentabilidade e acessibilidade, a substituição de incubadoras portáteis por sistemas isotérmicos tem o potencial de transformar a logística da PIVE, especialmente em regiões tropicais ou com infraestrutura limitada (LOUISE et al., 2019). Ao integrar dados morfofisiológicos, moleculares e econômicos, este estudo busca validar a hipótese de que as caixas isotérmicas representam uma alternativa viável, segura e escalável para o transporte de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia reprodutiva da fêmea Bovina

A reprodução em fêmeas bovinas é um processo regulado por interações neuroendócrinas, hormonais e ambientais, que influenciam diretamente a eficiência reprodutiva e a produtividade do rebanho (Ref) .

As vacas são animais poliéstricas não sazonais que apresentam ciclos estrais com duração média de 21 dias, que se repetem longo de todo o ano (LARSON et al., 1992; SARTORI et al., 2001). O ciclo estral bovino pode ser dividido em duas fases principais. Fase folicular, caracterizada pelo crescimento folicular sob baixas concentrações plasmáticas de progesterona. Esta fase se encerra com o desencadeamento pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) e, consequente ovulação. A fase folicular é sucedida pela fase lútea, caracterizada pela formação de um corpo lúteo funcional. Essa estrutura endócrina tem como principal função a síntese de progesterona, hormônio fundamental para a manutenção da gestação. Nas fêmeas não gestantes, a fase

lútea se encerra, por volta dos dias 17-18 do ciclo estral, com a secreção endometrial de Prostaglandina 2 α (PGF2 α), a qual desencadeia a luteólise e marca o início de uma nova fase folicular.

2.1.1. Controle hormonal do ciclo estral

O desenvolvimento sequencial das fases do ciclo estral é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Esse processo se inicia no hipotálamo com a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em pulsos de amplitude e frequência variáveis, os quais modulam na hipófise anterior a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Uma vez na corrente sanguínea, esses hormônios atuam diretamente nos ovários, coordenando os processos de crescimento folicular, ovulação e luteogênese (CLARKE et al., 2012; CROWE, 2011).

O FSH desempenha um papel fundamental no recrutamento de folículos antrais de cerca de 2-3 mm de diâmetro, iniciando uma nova onda de crescimento e maturação folicular. De forma complementar o LH contribui para o desenvolvimento final e intensificação da esteroidogênese folicular. Na ausência de um corpo lúteo funcional, a elevação do estradiol plasmático desencadeia o pico de LH e, conseqüentemente, cerca de 30 horas depois, a ovulação (GINTHER et al., 1998; IAN et al., 2009).

A partir do pico pré-ovulatório de LH, as células da teca interna e da granulosa iniciam o processo de luteinização e passam a sintetizar progesterona. No momento da ovulação, ocorre a ruptura da parede folicular e a liberação do

oócito, e a cavidade folicular preenchida por sangue e linfa e em seguida invadido pelas células em luteinização (IAN et al., 2009). O CL, portanto, é formado a partir dessas células que têm sua capacidade de sintetizar progesterona progressivamente aumentada, o que resulta em concentrações plasmáticas deste hormônio nos bovinos entre 2 e 5 ng/mL durante a fase lútea. As elevadas concentrações de progesterona, diminuem a pulsatilidade secretória do GnRH, bloqueia o desenvolvimento final e a ovulação de novos folículos (SATO et al., 2002).

2.1.2. Dinâmica folicular e seleção do folículo dominante

A dinâmica folicular refere-se ao processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos ovarianos ao longo de todo o ciclo estral da fêmea bovina. A compreensão desse processo finamente regulado por interações hormonais, possibilita a aplicação técnica de biotecnologias reprodutivas. (GINTHER et al., 2001).

Em bovinos, o crescimento folicular ocorre em forma de ondas. A maioria das fêmeas bovinas apresenta duas ou três ondas foliculares por ciclo estral, podendo haver variações de acordo com a raça e/ou idade. Cada onda folicular apresenta é caracterizada por três estágios principais: recrutamento, seleção e dominância foliculares (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). (SARTORI et al., 2001).

Durante o recrutamento um grupo de folículos antrais, com cerca de 3 a 5 mm de diâmetro, continuam seu crescimento sob o estímulo do FSH. À medida que crescem esses folículos começam também a secretar quantidades crescentes de estradiol e inibina (GINTHER et al., 2001). Dentre os folículos

recrutados, apenas um, ou, eventualmente, dois, prosseguem seu desenvolvimento, adquirindo a condição de folículo dominante, que possui a capacidade de continuar a crescer sob baixas concentrações plasmáticas de FSH (FORTUNE et al., 2001; GINTHER, 2000).

Quando o futuro folículo dominante (FD) atinge aproximadamente 8-10 mm de diâmetro, ele começa a inibir o crescimento de outros folículos, que entram em um processo de atresia. A dominância folicular se mantém por cerca de 4 a 6 dias, até que ocorra a ovulação ou a regressão folicular (GINTHER et al., 2001). O momento em que a taxa de crescimento do maior folículo dominante passa a ser maior que a dos demais folículos é denominado do desvio (GINTHER, 2016).

Cerca de 12 h antes do desvio, o futuro FD começa a apresentar um aumento nos receptores de LH nas células da granulosa, além de intensificar a sua síntese de estradiol e elevar a concentração intramolecular de fator de crescimento semelhante à insulina 1(IGF1) livre. (GINTHER, 2016). O folículo que emerge primeiro em cada onda apresenta maior diâmetro que os demais e tende a manter essa característica ao longo do desenvolvimento da onda. Essa característica o torna mais provável de se tornar o FD. Contudo, em algumas situações o segundo maior folículo da onda o ultrapassa e torna-se o FD (RAJAKOSKI, 1960).

A compreensão da dinâmica folicular tem aplicações diretas na reprodução bovina, especialmente em protocolos de sincronização do ciclo estral. Técnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação, sincronização do ciclo estral e PIVE dependem da manipulação exógena das concentrações plasmáticas dos hormônios reprodutivos para

controlar a emergência das ondas foliculares e a ovulação. Além disso, o conhecimento sobre a seleção do folículo dominante permite otimizar a resposta hormonal em vacas de diferentes categorias, garantindo maior eficiência nas taxas de concepção e na produção de embriões *in vitro* (MONTEIRO et al., 2017).

2.1.3. Reserva ovariana e implicações na fertilidade

A reserva ovariana, determinada geneticamente, corresponde ao número total de folículos primordiais presentes nos ovários no momento do nascimento, representando o potencial reprodutivo vitalício de uma fêmea bovina (MOSSA; EVANS, 2023a). Essa reserva, sofre um declínio contínuo à medida que os folículos são recrutados para crescimento ou destinados à atresia (CUSHMAN et al., 2024; KARL et al., 2022; SALES et al., 2015).

A reserva folicular é formada durante o desenvolvimento embrionário, quando as células germinativas primordiais se proliferam e iniciam a etapa de meiose para se tornarem oócitos primários, esses oócitos são cercados por células da pré-granulosa, formando os folículos primordiais (FORTUNE et al., 2013). Após o nascimento, a fêmea bovina não produz novos folículos, utilizando progressivamente sua reserva ovariana ao longo da vida. Esse estoque sofre um declínio contínuo, que se intensifica com o avanço da idade, levando à redução gradual da capacidade reprodutiva (MOSSA et al., 2023b). Por ser diretamente influenciada pela idade, a reserva ovariana é tipicamente mais elevada em novilhas do que em vacas adultas. Por essa razão, as novilhas são geralmente preferidas como doadoras em programas de PIVE (SILVA et al., 2020).

Fêmeas com maior reserva ovariana geralmente apresentam maior número de ondas foliculares por ciclo e maior produção de estradiol, resultando em maior expressão do estro, melhor sincronização reprodutiva e maior taxa de concepção (IRELAND et al., 2009). As vacas de origem *Bos indicus*, tendem a apresentar maior competência para o desenvolvimento embrionário em comparação a oócitos de vacas *Bos taurus*, devido a diferenças fisiológicas, como maior reserva folicular antral (VASCONCELOS et al., 2020)

A reserva ovariana influencia diretamente a eficiência de biotécnicas como a superovulação e a PIVE, uma vez que fêmeas com maior contagem de folículos antrais (CFA) apresentam melhor respostas à protocolos de estimulação com FSH, resultando em um maior número de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) por aspiração folicular e, conseqüentemente, uma maior produção de embriões (SARTORI et al., 2016; SANTOS et al., 2014). Portanto, vacas com maior reserva ovariana produzem mais descendentes durante sua vida reprodutiva. Além disso, animais com alta CFA possuem melhor qualidade oocitária, favorecendo o sucesso da PIVE (QUEIRÓZ et al., 2021; BARUSELLI et al., 2015; KARL et al., 2022).

2.2. Reprodução assistida em bovinos

2.2.1 Importância da reprodução assistida para o melhoramento genético e produtividade pecuária

A reprodução assistida desempenha um papel fundamental no setor pecuário, permitindo avanços significativos no melhoramento genético e na

produtividade dos rebanhos bovinos (PERRY et al., 2015). Tecnologias como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a PIVE, dentre inúmeras outras, possibilitam a disseminação de material genético de animais superiores, otimizando a eficiência reprodutiva e a seleção de características desejáveis (KEOGH et al., 2021; PERRY et al., 2015).

Com a crescente demanda global por produtos de origem animal, o incremento da eficiência produtiva e reprodutiva tornou-se uma prioridade dentro da pecuária moderna (LIMA et al., 2023). A reprodução assistida, ao permitir a seleção de reprodutores de alto valor genético, acelera o progresso genético dos rebanhos, reduzindo o intervalo de gerações e maximizando a produtividade (FERRÉ et al., 2020; VIANA et al., 2022).

2.2.2 Papel da transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões na eficiência reprodutiva e produtiva

A TE é uma ferramenta essencial para o aprimoramento da reprodução bovina, permitindo o aproveitamento do potencial reprodutivo de fêmeas geneticamente superiores. Esse método possibilita a obtenção de um maior número de descendentes por matriz ao longo de sua vida reprodutiva, além de viabilizar a rápida disseminação de características de alto interesse econômico (CIORNEI, 2021). A PIVE complementa a TE, ao permitir um melhor aproveitamento de oócitos de fêmeas de alto valor genético, independentemente do seu estágio fisiológico ou produtivo. Essa tecnologia possibilita a utilização de oócitos imaturos para fecundação *in vitro*, aumentando significativamente o número de embriões disponíveis para transferência, ampliando a variabilidade

genética e potencializando a produção de descendentes por animal (MERTON et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2014; SANCHES et al., 2019).

Além disso, tanto a TE quanto a PIVE desempenham um papel fundamental na preservação de linhagens genéticas valiosas e na manutenção da diversidade genética dentro dos rebanhos comerciais, um aspecto essencial para a sustentabilidade da produção bovina (JACQUES et al., 2023).

2.3 Aspiração Folicular

A aspiração folicular, ou *ovum pick-up* (OPU), é uma técnica amplamente utilizada na reprodução assistida bovina, permitindo a coleta de oócitos diretamente dos folículos ovarianos para posterior PIVE (PIETERSE et al., 1991). Essa técnica vem sendo fundamental para o avanço do melhoramento genético e preservação genética de diversas espécies.

A evolução da aspiração folicular está intimamente ligada aos avanços nas técnicas de reprodução assistida. Inicialmente, a coleta de oócitos era realizada por laparotomia ou laparoscopia, procedimentos invasivos que limitavam sua aplicação prática. Com o desenvolvimento da ultrassonografia transvaginal na década de 1980, tornou-se possível realizar a aspiração de folículos de forma menos invasiva e mais eficiente, permitindo recuperações repetidas de oócitos na mesma doadora (VARAGO et al., 2008; SITTA et al., 2017).

Atualmente, a aspiração folicular é realizada com o auxílio da ultrassonografia transvaginal. O procedimento inicia-se com a contenção

adequada do animal e a higienização da região perineal. Utiliza-se um transdutor acoplado a uma guia para a agulha de aspiração, que é introduzida na vagina até o fundo vaginal. Manipulando-se os ovários por via retal estes são posicionados contra a extremidade do transdutor de modo a se obter a sua imagem ultrassonográfica. A partir desse momento, os folículos passam a ser visualizados em tempo real, e a agulha é avançada de modo a perfurar o fundo vaginas alcançando os ovários e, a seguir a cavidade folicular, tornando possível aspirar o líquido folicular contendo o oócito. Em cada sessão são aspirados o maior número possível de folículos. O material coletado é então transportado para o laboratório, onde os oócitos são processados para a PIVE (FURKAN. M et al., 2022; PIETERSE et al., 1988)

Embora amplamente utilizada em bovinos, a aspiração folicular também é aplicada em outras espécies, como ovinos, caprinos e suínos. Em ovinos e caprinos, por exemplo, a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia tem sido empregada com sucesso para a obtenção de oócitos, permitindo a. (SITTA et al., 2017; ARAUJO et al., 2016) Em suínos, a aspiração folicular é utilizada para a recuperação de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) de fêmeas pré-púberes. (NEVES et al., 2019)

A frequência de aspirações foliculares pode variar conforme a espécie e os objetivos do programa reprodutivo. Em bovinos, sessões semanais ou quinzenais são comuns, permitindo a recuperação de oócitos sem comprometer a saúde ovariana da doadora (NEVES et al., 2004). Estudos indicam que a técnica pode ser repetida várias vezes na mesma doadora, possibilitando recuperações sucessivas de oócitos (BROADBENT et al., 1997).

Existem variações na técnica de aspiração folicular adaptadas às diferentes espécies e condições. Uma dessas variações é o flushing folicular, que consiste na lavagem do folículo puncionado imediatamente após a aspiração, visando aumentar a taxa de recuperação de oócitos, técnica utilizada para a punção folicular em equinos (MARQUES et al., 2022; RODRIGUES, 2006). Em bovinos, o flushing folicular tem demonstrado melhorar a obtenção de oócitos por aspiração ovariana, aumentando a taxa de recuperação e a qualidade dos oócitos coletados (COSTA et al., 2020).

2.3.1. Fatores que influenciam na qualidade oocitária

A qualidade dos oócitos obtidos através da OPU é influenciada por diversos fatores, entre os quais se destaca a idade da doadora. Vacas mais jovens tendem a apresentar maior população folicular, no entanto, a qualidade oocitária pode ser inferior em comparação às doadoras adultas (IWATA, 2016; WARZYCH et al., 2017). Outro fator importante é o estágio do ciclo estral no momento da aspiração, sendo que aspirações de folículos emergentes realizadas durante a fase lútea, resultam em melhores taxas de desenvolvimento embrionário (CALADO et al., 2005; MACHATKOVÁ et al., 1996).

O estado nutricional da fêmea a ser aspirada também é um fator crítico, pois deficiências energéticas ou proteicas comprometem a competência oocitária, reduzem as taxas de sucesso da maturação *in vitro*, e conseqüentemente a qualidade embrionária, e impactam negativamente a taxa de prenhez subsequente (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Alterações climáticas extremas, associadas a elevadas temperaturas foliculares (AL-KATANANI et al., 2002; KRISHER, 2013), bem como reduzidos níveis de bem-estar animal comprometem a qualidade oocitária e impactam negativamente a reprodução (FONSECA et al., 2017).

Finalmente, outro fator de suma importância é a habilidade do técnico. A técnica de OPU e manipulação subsequente dos CCOs, são fatores críticos para o sucesso da FIV. Durante os procedimentos de OPU é necessário cuidado extremo com a pressão utilizada para realizar as aspirações foliculares, pois uma pressão negativa inadequada pode levar a uma baixa taxa de recuperação oocitária. Por outro lado, se a pressão for excessiva, pode ocorrer lesões ovarianas e alterações morfofisiológicas COCs (SÁ et al., 2012). Uma das principais alterações observada relacionada com a mal regulação da pressão é o desnudamento oocitário parcial ou total, pode inviabilizar o uso do oócito para a PIVE (WARD et al., 2000).

Subsequente a aspiração, a manipulação dos COCs deve ser cuidadosa; processos como pipetagem, forma de armazenamento, meio utilizado e transporte até o laboratório, requerem cuidados específicos destinados a garantir a viabilidade dos mesmos (HASHIMOTO et al., 1999; TAVARES et al., 2024; WARD et al., 2000).

2.3.2. Critérios de seleção dos complexos cúmulos-oócitos para a PIVE

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) são classificados quanto à sua qualidade em quatro graus distintos, conforme suas características morfológicas.

Os CCOs de grau I consistem naqueles que apresentam mais de três camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo. Os de grau II caracterizam-se pela presença de uma a três camadas de células do *cumulus*, com citoplasma regular ou apresentando discretas granulações. Os CCOs classificados como grau III são identificados pela presença de menos de três camadas de células do *cumulus* ou por estarem parcialmente desnudos, exibindo ainda citoplasma irregular. Por fim, os CCOs de grau IV compreendem os oócitos completamente desnudos (ausência total de células do *cumulus*) ou aqueles em evidente degeneração, os quais podem apresentar *cumulus* expandido e citoplasma heterogêneo com granulações acentuadas (OLIVEIRA et al., 2014a; STOJKOVIC et al., 2001).

Esta classificação morfológica, amplamente adotada na literatura especializada, apresenta correlação direta com o potencial de desenvolvimento embrionário, sendo fundamental para a seleção adequada de CCOs com maior competência para fertilização e formação de embriões viáveis (OLIVEIRA et al., 2014b; ALM et al., 2005; STOJKOVIC et al., 2001)

Os CCOs que apresentam múltiplas camadas de células do *cumulus* intactas, citoplasma homogêneo, diâmetro adequado e vesícula germinativa bem definida são considerados de melhor qualidade, pois tendem a manter maior viabilidade durante a maturação *in vitro* (MIV) e por consequência, apresentam maior competência para o desenvolvimento embrionário (EMANUELLI et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2005; IAN et al., 2009; MACHATKOVA et al., 2004). Para a PIVE, são selecionados CCOs classificados como grau I, II e III, sendo que os graus I e II se destacam devido às suas características morfológicas e

metabólicas superiores. Esses CCOs também demonstram padrões mais eficientes de distribuição e reorganização mitocondrial antes e após a maturação *in vitro* (MIV), além de apresentarem níveis mais elevados de ATP, especialmente antes da maturação, em comparação aos oócitos de menor qualidade (graus III e IV) (STOJKOVIC et al., 2001).

Após a maturação, a expansão das células do *cúmulo* é um indicador importante da qualidade oocitária e seu potencial de desenvolvimento embrionário. (RAES et al., 2024) compararam três métodos manuais de avaliação da expansão do *cúmulo*-dos CCOs bovinos e desenvolveram o modelo de inteligência artificial AI-xpansion, que automatiza a medição com desempenho equivalente ao dos observadores humanos. O método de medição da área mostrou a maior confiabilidade, tanto inter quanto intra-observador. Além disso, oócitos com maior expansão do *cúmulo* apresentaram melhores taxas de desenvolvimento até blastocisto, confirmando a relevância da expansão como critério de seleção oocitária. O AI-xpansion oferece uma ferramenta objetiva e eficiente para otimizar esse processo na produção *in vitro* de embriões.

Atualmente, diversas abordagens utilizando inteligência artificial vêm sendo exploradas para otimizar a avaliação da qualidade oocitária. (HALL et al., 2024) desenvolveram um modelo baseado em *federated learning* para prever a competência oocitária a partir de imagens bidimensionais de oócitos de humanos em metáfase II, demonstrando boa sensibilidade na predição da formação de blastocistos utilizáveis. De forma semelhante, (DIMITRIADIS et al., 2022) revisaram o uso de IA em diversas etapas do laboratório de reprodução assistida em humanos, destacando seu potencial na classificação morfológica de oócitos

de humanos, na identificação da extrusão do corpúsculo polar, reforçando a capacidade dessa tecnologia de reduzir a variabilidade entre observadores e padronizar avaliações.

2.4. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica da reprodução assistida que consiste em realizar, fora do organismo materno, as etapas de maturação dos oócitos, fecundação e cultivo embrionário até o estágio de mórula ou blastocisto. Essa tecnologia replicar, em condições controladas, os eventos naturais que ocorrem no oviduto, ambiente especializado onde o oócito é fertilizado e o embrião inicia seu desenvolvimento (HAMDÍ et al., 2018; BANLIAT et al., 2019)

O progresso dessa biotecnologia teve início no final dos anos 1970 e início dos anos 1980, inicialmente em espécies laboratoriais. Com os avanços na recuperação, maturação e fertilização oocitária, assim como, cultivo embrionário, a técnica se tornou viável para uso em bovinos, ganhando destaque na década de 1990 com a introdução da punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (HASLER et al., 2014). O constante aumento da PIVE vem ganhando destaque nos últimos anos (ALBARRÁN-PORTILLO; POLLOTT, 2013). Em 2021, a produção mundial de embriões bovinos por PIVE registrou um aumento de 31,5% em relação ao ano anterior (Viana et al., 2021). Posteriormente, em 2023, observou-se um novo crescimento de 15,8% na produção global de embriões *in vitro* em comparação a 2022 (IETS, 2024).

No Brasil, a PIVE ganhou grande expressão a partir dos anos 2000, consolidando-se como uma biotecnologia estratégica para a pecuária nacional. O país se tornou referência mundial na utilização dessa tecnologia, sendo responsável por mais de 70% dos embriões produzidos na América do Sul (BARUSELLI et al., 2019; IETS 2024). Esse avanço foi impulsionado pela grande demanda por incremento genético, à eficiência dos protocolos de sincronização para a coleta de oócitos e à adaptação das técnicas às condições tropicais (BARUSELLI et al., 2019; CATTEEUW et al., 2017; BLODIN, 2015).

O sucesso comercial da PIVE no Brasil parecia estar atrelado a características particulares do mercado interno, como o alto valor econômico e o melhor rendimento de oócitos em raças zebuínas. No entanto, nos últimos anos, tem-se observado uma mudança nesse cenário: o aumento na produção de embriões de raças *Bos taurus* e mestiças, assim como a expansão da PIVE em outros países, indica uma possível convergência nas tendências globais da indústria de embriões (VIANA et al., 2017).

Entretanto, ainda assim, o Brasil é o segundo maior volume de produção e embriões *in vivo* no mundo, atrás dos Estados Unidos. Em 2023, os EUA aproximaram-se da marca de um milhão de embriões IVP (968.043), número que representa mais do que o dobro da produção brasileira. Além disso, o Brasil figura entre os oito países que, dentre os dez maiores produtores de embriões, reportaram maior volume de embriões produzidos *in vitro* em comparação aos produzidos *in vivo*. No entanto, quando se considera a intensidade de uso da tecnologia em relação ao tamanho do rebanho bovino, o país ocupa a 16^a

posição, evidenciando que ainda existe um grande potencial para expansão da utilização das biotecnologias reprodutivas no cenário nacional (IETS, 2024).

O processo de PIVE compreende três etapas principais: MIV, FIV e Cultivo *in vitro* (CIV) (VARAGO et al., 2008). Cada uma dessas etapas é fundamental para o sucesso da técnica e será detalhada a seguir, considerando seus princípios biológicos, as condições ideais de execução e os fatores que podem influenciar os resultados obtidos.

2.4.1. Maturação *In Vitro*

A MIV refere-se ao processo pelo qual os oócitos passam por uma série de mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares, tornando-se aptos à fecundação (GALLI et al., 2003; SMITZ et al., 2004). Os oócitos, que entram em prófase I durante o final do desenvolvimento fetal de fêmeas de mamíferos, permanecem no estágio diplóteno da prófase I até algumas horas que antecedem a ovulação. Durante esse período, o núcleo do oócito primário encontra-se em estágio dictióteno, caracterizada pela presença da vesícula germinativa (BORUM, 1961; GWATKIN et al., 1977). *In vitro*, a remoção dos oócitos do ambiente folicular e seu cultivo em meios apropriados de maturação induzem a retomada espontânea da meiose (COTICCHIO et al., 2015; VARAGO et al., 2008; THIBAUT, 1977)

A maturação nuclear corresponde à retomada da meiose, envolvendo a dissolução da vesícula germinativa, que contém os cromossomos oocitários condensados, e a progressão do oócito até a metáfase II (COTICCHIO et al.,

2015; VARAGO et al., 2008; ANGUITA et al., 2007; JONES, 2004). A maturação nuclear é considerada concluída quando observamos dois eventos-chave: a liberação do primeiro corpúsculo polar e a formação da placa metafásica. Nesse estágio, o oócito em maturação passa a ser denominado oócito secundário. Esse processo completo geralmente ocorre dentro de um período de 20 a 24 horas após o início do cultivo oocitário.

Simultaneamente a maturação nuclear, ocorre a maturação do citoplasma, que envolve uma série de alterações relacionadas à síntese proteica, migração e reorganização de organelas citoplasmáticas (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998), que prepara o oócito para as etapas futuras e protege da polispermia (FERREIRA et al., 2009). As células do cumulus se expandem e perdem a “gap junctions” (HYTTEL, 1988).

Durante a MIV, que ocorre em 22 a 24 horas, os eventos moleculares e bioquímicos são estritamente controlados para que se obtenha um gameta viável para a fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (WRENZYCKI; STINSHOFF, 2013). O meio utilizado para a maturação oocitária deve conter hormônios gonadotróficos (FSH e LH), os quais simulam o ambiente intrafolicular. A utilização de antibióticos como a penicilina e estreptomicina e meios de tamponamento como o HEPES são indispensáveis nesta fase, uma vez que esses meios são ricos em nutrientes e assim altamente susceptíveis a contaminação (OCAIA et al., 1994). Outro fator crítico é a atmosfera gasosa em que ocorre a MIV, que deve ter umidade saturada e conter 5% de CO₂ e 20% de O₂, de modo a controlar o pH e simular a tensão de O₂ existente no fluido folicular e tuba uterina (BAVISTER, 1995b).

2.4.2. Fertilização *In Vitro*

A FIV, consiste na incubação dos espermatozoides e oócito, células haploides, de modo que ocorra a fertilização e a formação do zigoto, uma célula diploide (GEORGADAKI et al., 2016). Para que isso ocorra, os espermatozoides capacitados devem se ligar a receptores da zona pelúcida (ZP) dos oócitos que estão em metáfase II.

A capacitação espermática *in vitro* ocorre através de glicosaminoglicanos presentes no meio de fecundação e processos de pré-capacitação. O espermatozoide capacitado, ao entrar em contato com receptores ZP3 presentes na ZP do oócito, e inicia a reação acrossômica, um evento caracterizado pela fusão das membranas plasmática e acrossomal externa e liberação do conteúdo acrossomal (OLIVEIRA et al., 2014a). As enzimas acrossomais, por sua vez, enfraquecem a zona pelúcida, que associado a hiperativação espermáticas, propicia a penetração e ligação aos receptores ZP2. Após alcançar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozoide funde-se a membrana vitelina e realiza a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Esse aumento na concentração de cálcio desencadeia o bloqueio da polispermia, impedindo a fecundação por múltiplos espermatozoides (VARAGO et al., 2008).

2.4.3 Cultivo *in vitro*

O desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* requer que os prováveis zigotos sejam mantidos em um ambiente controlado, conhecido como cultivo *in*

vitro (CIV). Durante essa fase, ocorre a ativação genômica do embrião, compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocela e rompimento da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999). Para que o embrião atinja o estágio de blastocisto, é fundamental que o CIV ofereça condições adequadas de suporte nutricional e fisiológico (SANGILD et al., 2000).

No desenvolvimento embrionário bovino, observam-se diferenças temporais significativas entre os processos *in vivo* e *in vitro*. Em condições naturais, a primeira clivagem embrionária ocorre aproximadamente 30 horas após a fecundação, sendo seguida pela segunda divisão celular num intervalo de 10 a 12 horas. Em contraste, em sistemas de cultivo *in vitro*, os embriões exibem um padrão distinto de clivagem, com picos de desenvolvimento característicos: atingem os estágios de 2 células em 36 horas, 4 células em 42 horas, 8 células em 60 horas e 16 células em torno de 102 horas após a fertilização (HAMILTON; LAING, 1946; LAING, 1949; GORDON, 1994). O cultivo geralmente se estende por aproximadamente sete dias, quando os embriões atingem o estágio de blastocisto. Os blastocistos formados no dia sete geralmente apresentam menor qualidade e menor taxa de euploidia em comparação àqueles formados no quinto ou sexto dia (COTITCHIO et al., 2023; CHERNOSHTAN, 2024).

2.5. Transporte de embriões bovinos e fatores críticos

O transporte de embriões é uma etapa fundamental dos programas comerciais de TE e transferência de embrião em tempo fixo (TETF), pois ao longo desse processo os embriões produzidos *in vitro* ou coletados de doadoras deve permanecer viáveis até chegarem ao trato reprodutivo da fêmea receptora, mais especificamente no corno uterino ipsilateral à ovulação.

Para que esse processo seja eficiente, diversos fatores devem ser rigorosamente controlados, incluindo a temperatura, o meio de conservação, a duração do transporte e a manipulação adequada dos embriões (STRINGFELLOW, 2008). No entanto, apesar da relevância do transporte de embriões dentro da PIVE, há poucas pesquisas e relatos na literatura científica sobre o tema. Os estudos mais relevantes relacionam-se ao transporte de oócitos (GALLAS LEIVAS et al., 2004; SHI-JIAN, 2004; SILVA et al., 2011).

2.5.1. Tipos de transporte de embriões bovinos

A maioria dos embriões utilizados na TE são utilizados a fresco, ou seja, após sua produção *in vitro* esses são envasados em palhetas francesas, identificados e levados até o local de transferência, tradicionalmente por incubadoras elétricas automáticas portáteis. No entanto, cada vez mais os embriões bovinos produzidos são criopreservados, o que permite que eles sejam armazenados e/ou transportados por tempo indeterminado imersos em nitrogênio líquido a -196 °C (KHURANA; NIEMANN, 2000; SERAPIÃO et al., 2005).

A congelação lenta é o modelo tradicional de criopreservação embrionária bovina, sendo amplamente utilizada, principalmente em programas comerciais. Essa técnica consiste na exposição gradual dos embriões a um crioprotetor permeável, permitindo a desidratação celular controlada antes do congelamento. Em seguida os embriões são submetidos a congelação controlada com a taxa de decréscimo de 0,3 á 0,5 °C por minuto, até que se atinja uma temperatura de -35 °C ou -65 °C de acordo com o protocolo utilizado (ASSUMPÇÃO et al., 2008; JUNG et al., 2024).

Além do modelo tradicional, a vitrificação de embriões se mostra uma alternativa para a criopreservação e transporte de embriões. Essa técnica consiste em um processo de ultra-resfriamento rápido, que transforma o meio contendo o embrião em um estado vítreo, sem formação de cristais de gelo. Esse processo protege as estruturas celulares, evitando os danos típicos da cristalização durante o congelamento (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Apesar das duas técnicas serem motivos de muitos estudos, as taxas de concepção obtidas com o uso de embriões criopreservados ainda é inferior a obtida com embriões inovulados a fresco (MARTÍNEZ-RODERO et al., 2024), sendo importante destacar que embriões produzidos *in vitro* apresentam maior sensibilidade ao processo de criopreservação quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (KHURANA; NIEMANN, 2000). Um importante gargalo para o sucesso de embriões congelados, independente da técnica empregada é a necessidade de estrutura e suporte laboratorial para a manipulação destes no momento da inovulação (ISHIMORI et al., 1993).

Finalmente, uma alternativa apresentada na literatura científica é o transporte de embriões resfriados, no entanto, as taxas de concepção obtidas com esses embriões são menores que as obtidas com embriões congelados (PINTO NETO et al., 1999),

2.5.2. Temperatura para transporte de embriões bovinos

A temperatura é um dos fatores mais críticos para a manutenção da viabilidade embrionária durante o transporte. Embriões frescos são geralmente transportados em meio de conservação em ambiente isotérmico em temperatura média de 38 °C, por períodos curtos (PUELKER et al., 2010), existindo evidências de que oscilações térmicas podem comprometer a integridade celular e reduzir as taxas de concepção pós-inovulação (PERRY et al., 2015). Temperaturas acima de 38.2 C° podem resultar em estresse oxidativo e consequente inibição do desenvolvimento e diminuição da viabilidade embrionária, principalmente quando associadas a alta tensão de oxigênio (HASLER, 2014), (RIVERA; HANSEN, 2001). Os efeitos deletérios relacionados à exposição embrionária a altas temperaturas são frequentemente mais evidentes após a eclosão embrionária (RYAN et al., 1992).

Da mesma forma, temperaturas demasiadamente inferiores podem resultar em baixas taxas de concepção e um alto número de embriões colapsados (LINDNER et al., 1983), uma vez que sob essas condições ocorre a redução do metabolismo embrionário, que pode não ser restaurado mesmo reexpondo esses embriões à temperaturas fisiológicas. Entretanto, existem relatos de que embriões que foram transportados a 36 °C apresentaram taxas

de desenvolvimento superiores às de embriões transportados a 38°C (PUELKER et al., 2010)

2.5.3. Meio de transporte

O meio utilizado para o transporte de embriões bovinos deve fornecer nutrientes essenciais para a manutenção embrionária e proteger os embriões contra estresse oxidativo. Meios comerciais, como o Dulbecco's PBS suplementado com soro fetal bovino (SFB 10%), são amplamente utilizados para o transporte de embriões (MAPLETOFT et al., 2022). Além disso, aditivos como albumina sérica e antioxidantes, como a cisteína, auxiliam na redução das espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem comprometer a integridade celular embrionária (ROCHA-FRIGONI et al., 2016).

No transporte de longa duração (>24 h), a depleção de glicose e aminoácidos no meio pode prejudicar o metabolismo embrionário. Para mitigar esse problema, muitos meios comerciais passaram a incluir sistemas de cultura sequencial ou microfluídica para a renovação contínua dos nutrientes (RODRIGUEZ-VILLAMIL, 2016). Outro fator de suma importância é a utilização de tampões adequados no meio, uma vez que o mesmo quando exposto a alta tensão de O₂ ocorrem alterações de pH que podem criar um ambiente embriotóxico (BAVISTER, 1995a).

2.5.4. Tempo de duração do transporte

Levando em consideração a localidade de grandes centros de produção *in vitro* de embriões e a distância até fazendas onde se encontram as receptoras, sabe-se que o tempo gasto no transporte pode ser uma grande barreira na viabilidade dos embriões e consequentemente na taxa de concepção (MARINHO et al., 2012a). Uma estratégia eficaz durante o transporte de longa duração é o emprego de meios de cultivo, com o fim do transporte coincidindo com as etapas final do cultivo (TORRES JÚNIOR; BARUSELLI, 2007). Essa estratégia permite o transporte de embriões por até 48 horas, o que equivale a um deslocamento de até 2.000 quilômetros (PONTES et al., 2011).

2.6. Transferência de embriões

A TE em bovinos é uma biotecnologia reprodutiva amplamente utilizada, visando aumentar a eficiência reprodutiva e promover a disseminação de material genético de alto valor. Esse procedimento envolve a coleta de embriões de fêmeas geneticamente superiores (doadoras) ou a PIVE a partir de oócitos obtidos por OPU, seguida de sua transferência para fêmeas receptoras, responsáveis por levar a gestação a termo (BARUSELLI et al., 2011).

A transferência embrionária é caracterizada pela deposição de um embrião, proveniente de uma fêmea doadora de alto valor genético ou produzido *in vitro* a partir de oócitos e espermatozoides de animais geneticamente superiores, no trato reprodutivo feminino, especificamente no corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentou a ovulação e contém o CL (PETER; FARIN, 1995; ROPER et al., 2018).

Esta biotécnica teve sua origem em 1891, quando Walter Heape realizou com sucesso a primeira transferência de embriões em coelhos, obtendo gestação e descendentes viáveis (BETTERIDGE, 2003). Em bovinos, a TE começou a ser desenvolvida em meados do século XX, tornando-se comercialmente viável apenas na década de 1970, quando ainda era realizada por laparotomia mediana sob anestesia geral inalatória (GONÇALVES et al., 2014; Hasler, 2014). No Brasil, o marco da TE ocorreu com a adoção em larga escala da produção *in vitro* de embriões a partir dos anos 2000 (Thibier, 2001).

Atualmente, a técnica de transferência de embriões (TE) apresenta avanços significativos, os quais têm facilitado e otimizado sua aplicação em larga escala (Hasler, 2014; PUGLIESI et al., 2023).

2.6.1. Seleção e preparação de receptoras

Um fator crítico para o sucesso na técnica de TE é a seleção minuciosa e sincronização das receptoras (CHOI et al., 2023), uma vez que em países como o Brasil há um excessivo número de embriões em relação ao número de transferências direta para receptoras (MARINHO et al., 2012b). É necessário que as receptoras tenham seus ciclos estrais sincronizados com a da doadora. Isso é fundamental para que o ambiente uterino se encontre adequando a idade embrionária. Para que essa sincronia seja alcançada, é necessária uma seleção criteriosa das receptoras e a implementação de protocolos hormonais precisos (BARUSELLI et al., 2011; VALENTE; BRANDÃO, 2019).

As receptoras assim como as doadoras devem passar por uma seleção minuciosa, que envolve avaliação clínica geral e ginecológica detalhadas (DANTAS et al., 2018). Após a avaliação e seleção das receptoras, se faz

necessário a escolha do protocolo de sincronização ideal para as fêmeas que serão empregadas. Para isso deve ser levada em consideração, a categoria animal, o escore corporal (ECC), idade e possibilidades de manejo da propriedade (BÓ et al., 2004a; MACIEJ SERDA et al., 2013) Atualmente no mercado brasileiro encontramos inúmeros protocolos de sincronização, com várias combinações de fármacos em diferentes doses e de diversas marcas.

Atualmente, os protocolos mais utilizados para a sincronização de receptoras bovinas, independentemente da categoria animal, baseiam-se na utilização de dispositivos intravaginais liberadores de progesterona, associados à administração de benzoato de estradiol. O estrógeno exógeno promove a regressão da onda folicular em curso e induz o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular. Após o estabelecimento de um folículo dominante, administra-se a prostaglandina $PGF_{2\alpha}$, com o objetivo de promover a luteólise de um possível corpo lúteo remanescente e, conseqüentemente, reduzir as concentrações circulantes de progesterona. Simultaneamente, é realizada a aplicação de gonadotrofinas com atividade FSH, sendo o eCG (gonadotrofina coriônica equina) a substância mais comumente empregada, favorecendo o crescimento final do folículo dominante. Para a indução da ovulação, utiliza-se uma fonte de LH, sendo o cipionato de estradiol ou o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) os fármacos mais frequentemente adotados. Vale ressaltar que os protocolos podem apresentar variações em função da categoria animal, idade, escore corporal, peso e sobretudo da logística e das condições de manejo da propriedade. (BÓ et al., 2004b; MACIEJ SERDA et al., 2013; MARINHO et al., 2012b; VIEIRA; PAZZIM, 2021) .

2.6.2. Inovulação

A inovulação consiste na deposição do embrião na porção final do corno uterino ipsilateral ao CL (DEL CAMPO et al., 1977; LEIBO, 1984). Antes da realização do procedimento, as receptoras devem estar devidamente contidas e serem avaliadas quanto a presença e tamanho do CL e, preferencialmente, se este possui adequada irrigação sanguínea (PUGLIESI et al., 2023). A seguir realiza bloqueio epidural baixo entre as vértebras S5 e C1 ou C1 e C2 (BIGHAM et al., 2010). O anestésico de eleição para este procedimento é a lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Antes da sua administração, devem ser realizadas tricotomia e assepsia do local de aplicação. A seguir a agulha hipodérmica deve ser inserida no espaço intervertebral até que a sua extremidade alcance o espaço epidural, onde o anestésico deve ser liberado (MALTERA et al., 1956).

Uma vez terminada a avaliação e preparação da receptora, a palheta contendo o embrião é inserida no inovulador que a seguir é recoberto por uma bainha sanitária estéril. Para minimizar o risco de contaminação do trato uterino no momento da inovulação, o aplicador montado deve ser envolvido por uma camisa sanitária, que mantém a bainha livre de contaminantes durante o procedimento (GIVENS et al., 2008) (Hasler, 2014). O reconhecimento materno ocorrerá entre os dias 12 a 14 pós a realização da FIV, quando o embrião viável secreta Interferon Tau ($IFN\tau$) que inibe a síntese de receptores endometriais de ocitocina, assim bloqueando a síntese de prostaglandina $PGF2\alpha$.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia da reprodução bovina tem evoluído significativamente nas últimas décadas, sendo a PIVE e a TE ferramentas amplamente empregadas com o intuito de acelerar o progresso genético e otimizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos. No entanto, para que esses avanços tecnológicos se traduzam em resultados efetivos a campo, é imprescindível que todas as etapas do processo reprodutivo sejam cuidadosamente executadas, incluindo o transporte e a transferência dos embriões.

O transporte de embriões, embora muitas vezes tratado como uma etapa secundária, representa um elo crítico entre a produção laboratorial e a aplicação prática da biotecnologia no campo. A literatura demonstra que fatores como a temperatura, o meio de conservação, a duração do transporte e a manipulação embrionária são determinantes para a manutenção da viabilidade dos embriões até o momento da transferência. Nesse sentido, métodos tradicionais, como o uso de incubadoras portáteis e o transporte em meio aquecido, continuam sendo amplamente adotados, embora haja espaço para melhorias em padronização e validação técnica.

Além dos desafios logísticos, a escolha e o manejo das receptoras influenciam de forma significativa os resultados. A sincronização hormonal precisa, a seleção adequada das fêmeas receptoras com base em critérios reprodutivos e sanitários, bem como a correta execução da técnica de transferência são essenciais para se obter boas taxas de sucesso.

Dessa forma, pode-se afirmar que o sucesso da biotecnologia reprodutiva em bovinos não se restringe à competência técnica em laboratório, mas envolve uma abordagem integrada que engloba desde a produção até a

transferência do embrião. Em especial, o transporte de embriões frescos desponta como uma alternativa promissora e prática, desde que sejam respeitados aspectos fisiológicos fundamentais, como a manutenção de temperatura constante e o uso de meios de conservação adequados.

Em suma, esta revisão reforça a importância do transporte de embriões como etapa determinante para o sucesso da TE, destacando que avanços nessa área podem representar um salto qualitativo para os sistemas comerciais aplicados à bovinocultura nacional. Assim, o aprofundamento das investigações sobre esse tema é não apenas justificável, mas necessário para o contínuo aprimoramento das técnicas reprodutivas e sua consolidação como ferramentas efetivas no campo.

4. HIPÓTESE E OBJETIVOS

4.1. Hipótese(s)

A hipótese deste estudo é que os embriões submetidos ao transporte em caixa isotérmica terão taxa de eclosão e subsequente taxa de prenhez semelhantes às taxas obtidas com o transporte de embriões em incubadora elétricas portátil de embriões.

4.2. Objetivo(s) geral(s)

Validar o transporte de embriões utilizando a caixa isotérmica como uma alternativa viável para o transporte de embriões bovinos.

4.3. Objetivo(s) específico(s)

- Validar dados de temperatura de transporte da caixa isotérmica;
- Avaliar as taxas de eclosão de embriões submetidos ao transporte em caixa isotérmica *in vitro* e compará-las com as obtidas com embriões transportados em incubadoras elétricas tradicionais;
- Verificar as taxas de concepção obtidas a partir da transferência de embriões submetidos ao transporte em caixa isotérmica *in vitro* e compará-las com as obtidas com embriões transportados em incubadoras elétricas tradicionais;

5. REFERÊNCIAS¹

ALBARRÁN-PORTILLO, B.; POLLOTT, G. E. The relationship between fertility and lactation characteristics in Holstein cows on United Kingdom commercial dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 635–646, 1 jan. 2013.

AL-KATANANI, Y. M. et al. Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows 1. **J. Dairy Sci**, v. 85, p. 390–396, 2002.

ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194–2205, 1 maio 2005.

ANGUITA, B. et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 526–536, 1 fev. 2007.

¹ Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74p.

ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. et al. In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. **Animal Reproduction (AR)**, v. 5, n. 3, p. 116-120, 2018.

BANLIAT, C. et al. Stage-dependent changes in oviductal phospholipid profiles throughout the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 65–72, 1 set. 2019.

BARUSELLI, P. S. et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583–1593, 1 dez. 2011.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v. 1, n. 2, p. 91–148, 1995a.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v. 1, n. 2, p. 91–148, 1 jan. 1995b.

BIGHAM, A. S. et al. Caudal epidural injection of lidocaine, tramadol, and lidocaine–tramadol for epidural anesthesia in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 5, p. 439–443, 1 out. 2010.

BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 1-22, 2004.

BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, 2004b.

BROADBENT, P. J. et al. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1027–1040, 1 abr. 1997.

CAMARGO, G. S. et al. Evaluation of blastocyst re-expansion, quality in relation to storage temperature, and sexing using blastocoel fluid after manual perforation with a hand-held needle involving in vivo produced equine embryos. **Theriogenology**, v. 219, p. 39–48, 15 abr. 2024.

CARVALHO NEVES, A. et al. Ovarian morphometric evaluation and recovery of Cumulus-oocyte complexes from prepubertal females swine by follicular aspiration and ovarian slicing. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ser.ufpr.br/veterinary>.

CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 98–106, jan. 2008.

CHOI, W. et al. Evaluation of Corpus Luteum and Plasma Progesterone the Day before Embryo Transfer as an Index for Recipient Selection in Dairy Cows. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2023.

CIORNEI, Ștefan Gregore. Embryo Transfer. In: **Animal Reproduction**. IntechOpen, 2021.

CLARKE, I. J. et al. Neuroendocrine Control of Reproduction. **Handbook of Neuroendocrinology**, p. 197–235, 1 jan. 2012.

COTICCHIO, G. et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 4, p. 427–454, 2015.

CRISTINA VARAGO, F.; FERNANDES MENDONÇA, L.; DE ALBUQUERQUE LAGARES, M. Rev Bras Reprod Anim. v. 32, n. 2, p. 100–109, 2008.

CRISTINA, Fabiana; FERNANDES, Luiza; DE ALBUQUERQUE, Monique. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.

CURRIN, L.; BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. In vitro production of embryos from prepubertal holstein cattle and mediterranean water buffalo: Problems, progress and potential. **Animals MDPI AG**, , 1 ago. 2021.

CUSHMAN, R. A. et al. Developmental programming of the ovarian reserve in livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 264, 1 maio 2024.

DANTAS, K. S. DE A. et al. Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (pive) em bovinos no nordeste do Brasil. **Ciênc. Anim. (Impr.)**, p. 3–16, 2018.

DAVIS, T. C.; WHITE, R. R. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. **Theriogenology**, v. 150, p. 27–33, 1 jul. 2020.

DE ARAUJO, E. A. B. et al. Aspiração folicular videolaparoscópica comparativa em ovelhas Dorper e Santa Inês. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 98–104, 2016.

DE MEDEIROS COSTA LINS, A.; NOVAES DOS REIS, A. **Ciência Animal**, v.30, n.1. [s.l: s.n.].

DE VASCONCELOS, G. L. et al. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, in vitro embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, p. 106357, 1 jun. 2020.

DEL CAMPO, M. R. et al. Unilateral Relationship of Embryos and the Corpus Luteum in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 580–585, 1 jun. 1977.

DIMITRIADIS, I. et al. Artificial intelligence in the embryology laboratory: a review. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 44, n. 3, p. 435–448, 1 mar. 2022.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. **Theriogenology**, v. 125, p. 277–284, 1 fev. 2019.

EMANUELLI PICADA ISABELE. Interação cumulus e oócito no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos in vitro. 18 mar. 2005.

FERRAZ, P. A. et al. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1834–1841, 15 out. 2016.

FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 1 jan. 2020.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 15 mar. 2009.

FONSECA JUNIOR, A. M. DA. Influência do sombreamento artificial na qualidade de embriões bovinos produzidos no Semiárido. 1 fev. 2017.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648–654, 1 set. 2001.

FORTUNE, J. E. et al. TRIENNIAL REPRODUCTION SYMPOSIUM: The ovarian follicular reserve in cattle: What regulates its formation and size?., **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 7, p. 3041–3050, 1 jul. 2013.

GALLAS LEIVAS, F. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 219–224, fev. 2004.

GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599–616, 15 jan. 2003.

GEORGADAKI, K. et al. The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine** Spandidos Publications, , 1 out. 2016.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 61–79, 2 jul. 2000.

GINTHER, O. J. et al. Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 345–350, 1 ago. 2001.

GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 85–99, 1 out. 2016.

GIVENS, M. D.; MARLEY, S. D. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 129–136, 1 jan. 2008.

HALL, J. M. M. et al. Use of Federated Learning on distributed data to develop an artificial intelligence for predicting usable blastocyst formation from pre-ICSI oocyte images. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 49, n. 6, p. 104403, 1 dez. 2024.

HAMDJ, M. et al. Bovine oviductal and uterine fluid support in vitro embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 7, p. 935–945, 2 jul. 2018.

HASHIMOTO, S. et al. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 757–765, 1 jan. 1999.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152–169, 1 jan. 2014.

HERNANDEZ, M. M. et al. Electrophoresis profile of bovine cumulus cells as related to oocyte quality and in vitro maturation. **Animal reproduction**, v. 13, p. 470–470, 2005.

MARTIN, Ian; FERREIRA, João Carlos Pinheiro. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 270-279, 2009.

IDAMOKORO, E. M. The relevance of livestock husbandry in the context of food security: a bibliometric outlook of research studies from 1938 to 2020. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 2023.

IRELAND, J. J. et al. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 954–964, 1 maio 2009.

ISHIMORI, H. et al. Vitriification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 427–433, 1 ago. 1993.

IWATA, H. Age-associated events in bovine oocytes and possible countermeasures. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 15, n. 3, p. 155–164, 1 jul. 2016.

JACQUES, A. et al. Reintroducing genetic diversity in populations from cryopreserved material: the case of Abondance, a French local dairy cattle breed. **Genetics Selection Evolution**, v. 55, n. 1, 1 dez. 2023.

JOHAN SMITZ et al. Oocyte in vitro maturation. p. 145–182, 26 jul. 2004.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2004.

JUNG, S. et al. Slow freezing cryopreservation of Korean bovine blastocysts with an additional sucrose pre-equilibration step. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1400899, 10 abr. 2024.

KARL, K. R. et al. Limitations in use of ovarian reserve biomarkers to predict the superovulation response in small ovarian reserve heifers. **Theriogenology**, v. 182, p. 53–62, 1 abr. 2022.

KEOGH, K. et al. Genome-wide association study of economically important traits in Charolais and Limousin beef cows. **Animal**, v. 15, n. 1, p. 100011, 1 jan. 2021.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 313–326, 15 jul. 2000.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. Volume 1, 2013, p. 393–417, 1 jan. 2013.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255–267, 1 ago. 1992.

LEIBO, S. P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 21, n. 5, p. 767–790, 1 maio 1984.

LINDNER, G. M. et al. Survival of bovine embryos stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 20, n. 3, p. 311–319, 1 set. 1983.

LOIOLA, M. V. G. et al. Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 93–101, 2014.

LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1 set. 1999.

LOONEY, C. R. et al. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 67–72, 1 jan. 1994.

LOPES, G. V. R. [UNESP]. Efeito do estresse térmico sobre embriões equinos produzidos in vivo durante simulação de transporte. 10 out. 2024.

LOUISE, R.; GONÇALVES, R.; MOREIRA VIANA, J. H. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo Current status of cattle embryo production in Brazil and in the world. 2019.

MACHATKOVÁ, M. et al. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 801–810, 1 mar. 1996.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 329–335, 15 jan. 2004.

MACIEJ SERDA et al. Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza. **Uniwersytet śląski**, v. 7, n. 1, p. 343–354, 2013.

MALTERA ANTONIO ERNESTO. **Vista do Contribuição para o estudo da anestesia epidural nos bovinos**. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/rfmvusp/article/view/62402/65203>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

MAPLETOFT, R. J. et al. EVOLUTION OF KNOWLEDGE ABOUT OVARIAN PHYSIOLOGY AND ITS CONTRIBUTION TO THE APPLICATION OF REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGIES IN SOUTH AMERICA. **Spermova**, v. 12, n. 1, p. 140–151, 2022.

MARINHO, L. S. R. et al. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. **Anim Reprod**, n. 9, p. 323–328, 2012a.

MARINHO, L. S. R. et al. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. **Animal Reproduction (AR)**, v. 9, n. 3, p. 323–328, 2018.

MARQUES, D. B. Fatores que influenciam na eficiência do programa de ICSI em equinos. 17 jan. 2022.

MARQUES DE LIMA, W. et al. Current challenges and perspectives of in vivo and in vitro commercial embryo production of taurine and synthetic breeds. 2023.

MARTÍNEZ-RODERO, I. et al. In silico-designed vitrification protocols: an approach to improve survival of in vitro produced-bovine embryos. **Reproduction**, v. 167, n. 6, 1 jun. 2024.

MAX, M. C. et al. In vitro embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo transport. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1–3, p. 286–289, jun. 2012.

MERTON, J. S. et al. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885–893, 15 out. 2009.

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, 1 mar. 2017.

MOSSA, F.; EVANS, A. C. O. Review: The ovarian follicular reserve – implications for fertility in ruminants. **Animal** Elsevier B.V., , 1 maio 2023a.

MOSSA, F.; EVANS, A. C. O. Review: The ovarian follicular reserve – implications for fertility in ruminants. **Animal**Elsevier B.V., , 1 maio 2023b.

NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. Biotécnicas reprodutivas para aceleração do melhoramento genético. 2014.

OCAIA, J. M. et al. The influence of different types of media supplement on the maturation of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**. 1994.

OLIVEIRA, C. S. et al. Documentos 175 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014a.

OLIVEIRA, C. S. et al. Documentos 175 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014b.

Ovum pick up (opu) by transvaginal ultrasonography in cattle. **International Journal of Veterinary Science**, n. Volume 1, p. 180–186, maio 2022.

PERRY, GA; DALTON, JC; GEARY, TW Fatores de manejo que influenciam a fertilidade em programas de melhoramento genético de gado de corte. **Boise: Proceedings, Estratégias Reprodutivas Aplicadas em Gado de Corte - Noroeste**, 2011.

PIETERSE, M. C. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 751–762, 1 out. 1988.

PIETERSE, M. C. et al. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 857–862, 1 abr. 1991.

PINTO NETO, A. et al. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5°C em contêiner modelo Celle modificado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 159–162, 1999.

PONTES, J. H. F. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640–1646, 1 jun. 2011.

PUELKER, R. Z. et al. 228 EVALUATION OF EMBRYO VIABILITY AFTER PROLONGED TRANSPORT IN DIFFERENT MEDIA AND AT DIFFERENT TEMPERATURES. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 213–213, 7 dez. 2010.

PUGLIESI, G. et al. Review: Current status of corpus luteum assessment by Doppler ultrasonography to diagnose non-pregnancy and select embryo recipients in cattle. **animal**, v. 17, p. 100752, 1 maio 2023.

QUEIRÓZ, F. M. DE et al. Ovarian superstimulation with FSH in Wagyu breed bovine donors impacts follicular dynamics but does not improve the amount of embryos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e165101018811, 7 ago. 2021.

RAES, A. et al. Manual versus deep learning measurements to evaluate cumulus expansion of bovine oocytes and its relationship with embryo development in vitro. **Computers in Biology and Medicine**, v. 168, p. 107785, 1 jan. 2024.

RAJAKOSKI, E. The Ovarian Follicular System in Sexually Mature Heifers with Special Reference to Seasonal, Cyclical, and Left-Right Variations. **Acta Endocrinologica**, v. 34, n. 3_Supplement, p. S7–S68, 1 ago. 1960.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 107–115, 1 jan. 2001.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S. et al. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1897–1905, 1 nov. 2016.

RODRIGUES, R. Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultrassom em eqüinos. 2006.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P. Transport of bovine embryos in a chemically defined medium at ambient temperature. 2016.

RYAN, D. P. et al. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3490–3497, 1 nov. 1992.

SÁ, M. A. F.; 106.464.587-95; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/7704950446457549](http://LATTES.CNPQ.BR/7704950446457549). Avaliação de diferentes pressões negativas na aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom sobre a recuperação oocitária em éguas. 17 jul. 2012.

SALES, J. et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. 2015.

SANCHES, B. V.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 394–401, 28 nov. 2019.

SANGILD, P. T. et al. Blood Chemistry, Nutrient Metabolism, and Organ Weights in Fetal and Newborn Calves Derived from In Vitro-Produced Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1495–1504, 1 jun. 2000.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

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, 1 jul. 2016.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 422–432, jul. 2010.

SATO, M. et al. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 21–52, abr. 2002.

SERAPIÃO, R. V. et al. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1–3, p. 58–61, 2005.

SHI-JIAN, T. Industrial Production of Cow Embryos by IVP Technique-Effects of Holding Temperature for Long Distance Transport of Ovaries. **Chinese Journal of Veterinary**, 2004.

SILVA, L. G. DA. Produção in vitro de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH. p. 67–67, 2020.

SILVA, L. K. X. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 74–80, fev. 2011.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 119–125, 30 dez. 2014.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483–497, 15 jan. 1998.

MARIANO, R. S. G. et al. Aspiração folicular em ruminantes—revisão de literatura. **Revista Investigação**, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015.

SOUZA-FABIAN, J. M. G. et al. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 2, p. 31–54, 8 jan. 2021.

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. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 1 mar. 2001.

STRINGFELLOW, D. & S. S. (1998). Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. 2008.

TAVARES, W. C. M. et al. Impact of the near-physiological temperature on the in vitro maturation of bovine oocytes: A comparative proteomic approach. **Theriogenology**, v. 228, p. 64–74, 15 out. 2024.

TORRES JÚNIOR, J. R. DE S.; BARUSELLI, P. S. Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico. , 2007. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001602454>>. Acesso em: 6 abr. 2025

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236–244, 7 jan. 2006.

VALENTE, G.; BRANDÃO, R. Revisão de Literatura: Transferência de Embriões em Bovinos. 9 jul. 2019.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. 2022.

VIEIRA, L.; PAZZIM, L. Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura. 29 set. 2021.

WARD, F. A. et al. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 433–446, 1 ago. 2000.

WARZYCH, E. et al. Prepubertal heifers versus cows—The differences in the follicular environment. **Theriogenology**, v. 87, p. 36–47, 1 jan. 2017.

WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. SUPPL.1, p. 38–43, set. 2013.

CAPÍTULO 2.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23

Bovine embryo transportation in isothermal box: an alternative to the automatic commercial system

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP - FMVZ Botucatu, São Paulo, Brazil)

³College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA, USA

Corresponding author:

Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP 18618–681, Brazil.

Tel: +55 14 38802121; Email: joao.cp.ferreira@unesp.br

ABSTRACT

This study aimed to validate the use of an isothermal box for transporting in vitro-produced bovine embryos. In Experiment 1, the thermal stability of the isothermal box was evaluated under different ambient temperatures after preheating. In Experiment 2, cumulus-oocyte complexes obtained by transvaginal follicular aspiration were subjected to in vitro embryo production. The resulting embryos were packaged in 0.25 mL straws and randomly assigned to two groups: a conventional group (n = 109), in which embryos were maintained at 38 °C in a portable incubator, and an isothermal box group (n = 98), in which embryos were stored in an isothermal container with a rigid artificial ice block preheated and stabilized at 38 °C. Hatching rates were assessed at 12, 24, and 36 hours through extended in vitro culture, with no statistical differences observed between groups. In Experiment 3, embryos were transferred to 64 recipient cows (37 in the conventional group and 27 in the isothermal group), and pregnancy rates were evaluated at 30 and 60 days of gestation. No significant differences were observed in hatching rates (P = 0.8937), pregnancy rates (P = 0.8809), or early embryonic loss (P = 0.5737) between the two methods. These findings indicate that using a preheated isothermal box is a viable and low-complexity alternative to conventional embryo transport systems, maintaining embryo viability and resulting in similar in vitro development and pregnancy outcomes.

Keywords: in vitro fertilization, hatching rate, pregnancy rate, follicular aspiration, in vitro culture

1. Introduction

In vitro embryo production (IVEP) is a crucial reproductive biotechnology whose application is continually expanding in the modern cattle industry [1,2]. This technique enables the large-scale production of high-quality embryos, facilitating the accelerated improvement of herds and enhancing reproductive efficiency [3]. However, to fully achieve all the benefits of this reproductive biotechnique, it is essential to guarantee embryo viability at every stage of the process [4], from the selection of donors to the transfer of embryos to synchronized recipients [5–7].

Despite its direct impact on embryo quality and viability, embryo transportation still receives relatively little attention in the scientific literature [8]. During transportation, embryos are subjected to a series of stressors, including temperature variations, inadequate humidity, vibrations, and improper handling, which can compromise their integrity and reduce conception rates [9–11]. Traditionally, embryos are packed in specific culture media and transported in electric portable incubators, which maintain a controlled temperature [12,13]. However, this method has significant limitations, including high costs, dependence on energy sources, and the need for constant maintenance, which can render its use unfeasible in remote regions or areas with limited resources [14].

Faced with these challenges, the search for economically viable, technically effective alternative transportation methods is welcome [15]. One promising alternative is the use of isothermal boxes, which can maintain a stable temperature for extended periods without requiring external energy sources [16]. These boxes, when pre-heated, can be a practical and affordable solution for embryo transportation, especially in places where access to portable incubators is limited. Preliminary studies have shown that isothermal boxes can be as effective as traditional methods in maintaining embryo and

gamete viability in various species [17]. However, significant gaps remain in the literature regarding their use, and consequently, further studies are needed to validate their application.

This study aimed to validate an alternative method for transporting *in vitro*-produced bovine embryos using an isothermal box preheated and stabilized at 38°C. The evaluation assessed the morphological quality, hatching, and pregnancy rates of *in vitro*-produced blastocysts after a simulated 6-hour transport period, aiming to achieve similar outcomes to those obtained using a traditional portable embryo incubator.

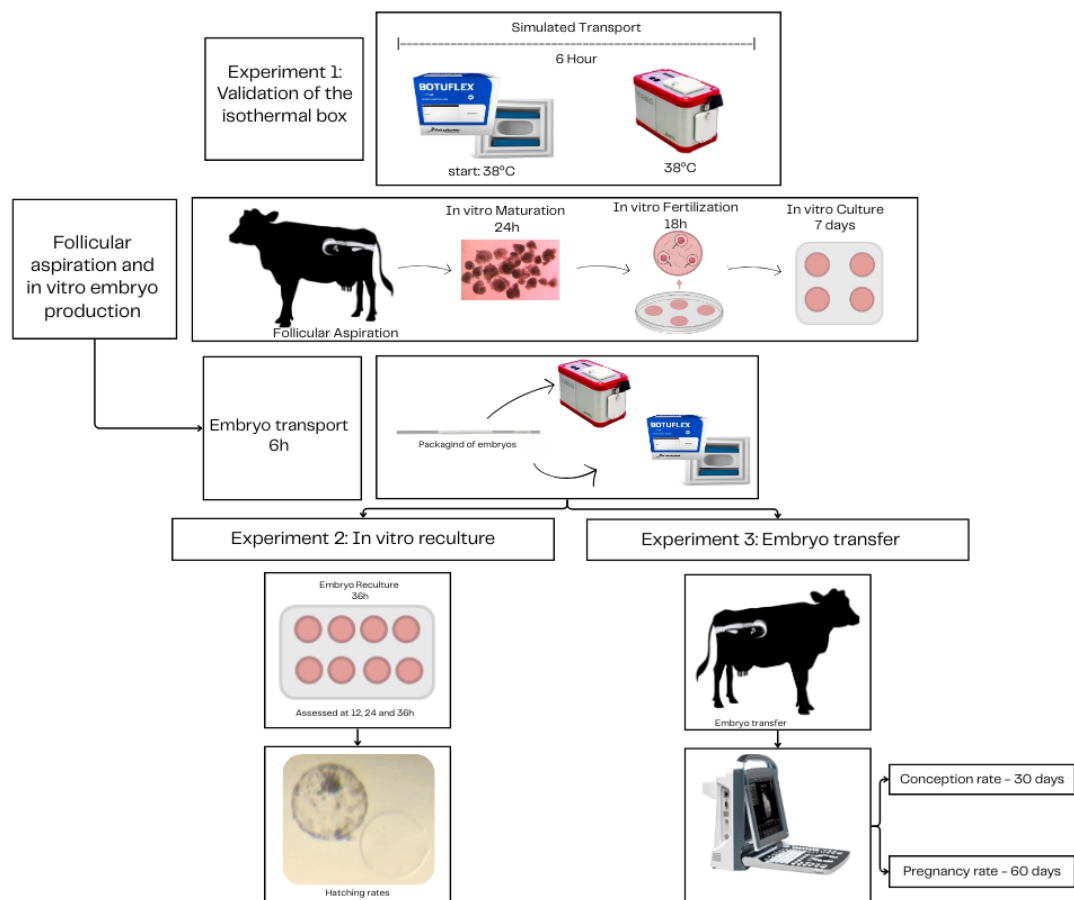
2. Materials and methods

2.1. Ethical aspects

The project was conducted in accordance with the recommendations of the National Council for Animal Experimentation (CONCEA, Brazil) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (CEUA, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; Permit number 000.287).

2.2. Experimental design

90 The experimental procedures of the present study are summarized in Figure 1



91

92

93 **Figure 1** Experimental design. This study was divided into 3 experiments: Experiment 1

94 – Isothermal box validation. Using data loggers, the internal and external temperature

95 curves of the isothermal box were monitored during a simulated 6-hour transport period.

96 Based on this, experiments 2 and 3 were performed using OPU. In both experiments, the

97 recovered cumulus oocyte-complexes (COCs) were subjected to IVEP. After *in vitro*

98 culture, embryos were loaded into 0.25 mL straws and randomly divided into two groups:

99 the Conventional Group, where embryos were maintained at 38°C in an electric Versatile

100 Shipping Incubator (WTa), and the Isothermal Box Group, where embryos were placed

101 in an isothermal box (Botuflex®; Botupharma, Brazil) set up with 2 rigid artificial ice

102 block pre-heated and stabilized at 38 °C. Both groups underwent the simulated 6-hour

transport and were then used in the following experiments. After the simulated transport, in Experiment 2, embryos were *in vitro* recultured, and their hatching rates were evaluated at 12, 24, and 36 hours. In Experiment 3, they were *in vivo* inoculated, and conception rates were monitored at 30 and 60 days of gestation.

2.3. Experiment 1: Validation of the isothermal box

This experiment aimed to validate the use of an isothermal box (Botuflex®, Botupharma, Brazil) originally designed for semen transport at 15 or 15 °C, for transporting embryos at an initial target temperature of approximately 38 °C.

Although the box was originally designed to promote a controlled temperature decrease and then stabilize internal temperatures at 5°C or 15°C, it was adapted here for maintaining a higher temperature suitable for 7-day bovine embryo transport.

The box has three internal slots (fig. 2): two lateral compartments for rigid ice packs (pre-cooled to -20 °C), and a central compartment designated for the biological sample. When configured with one or two ice pack, the box typically stabilizes at °C or 5 °C, respectively.

To evaluate the box's ability to maintain an internal temperature of approximately 38°C, 4 tests were conducted on different days under varying ambient conditions. For each test, two rigid artificial ice packs were pre-heated to 43 °C and placed in the lateral compartments. The box was then closed, and its inner temperature was monitored using two dataloggers: one inside the sample compartment and another on the outer surface to track environmental conditions. At each test, the time it took for the box to reach 38 °C was recorded, and then its internal temperature was monitored hourly for 6 hours to assess its thermal stability.

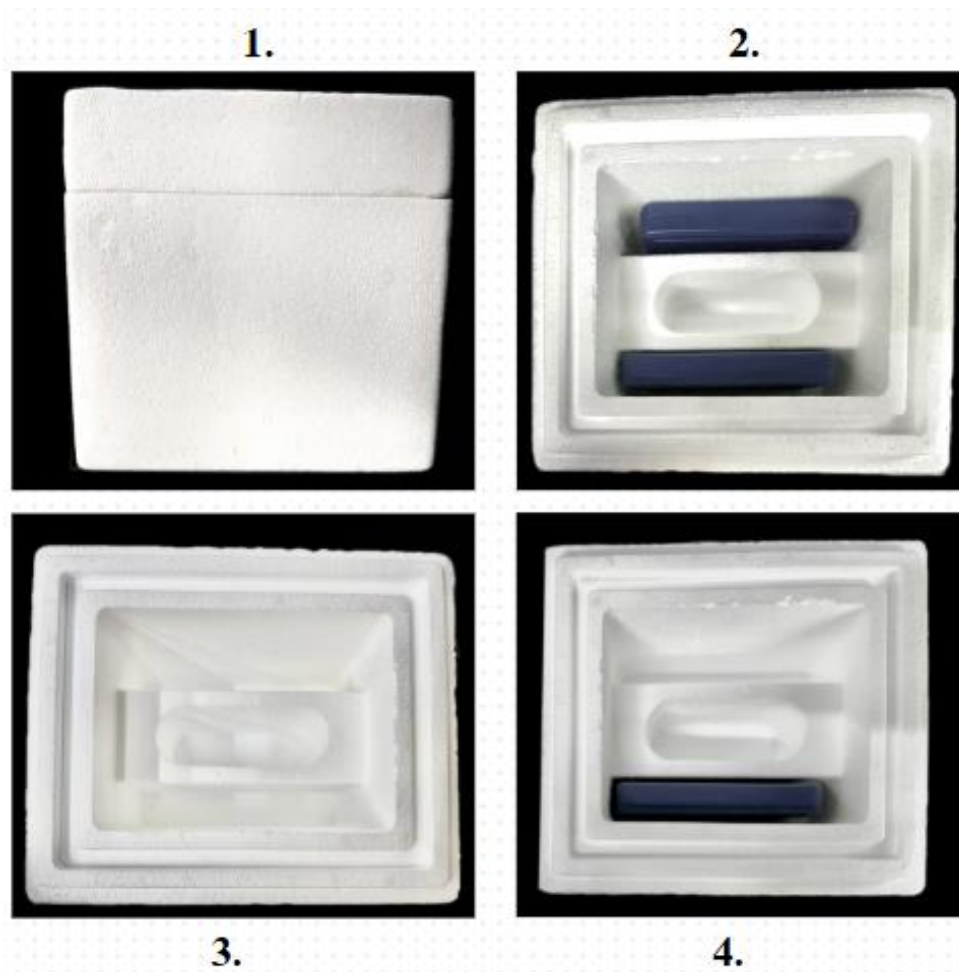


Figure 2 Structural components of the thermal box model used in the experiment. The images respectively illustrate: (1) lateral view of the thermal box; (2) Internal view with two rigid artificial ice packs inserted.; (3) Internal view showing the sample compartment and lateral slots for ice packs; (4) Internal view with one rigid artificial ice pack inserted.

2.4. Experiment 2: *In vitro* viability of bovine embryos following 6-hour simulated transport in the Botuflex® isothermal box.

This experiment aimed to investigate the effect of a 6-hour simulated transport in the Botuflex® isothermal box, which had been previously heated to 38 °C, on the *in vitro* viability of bovine embryos produced *in vitro*.

2.4.1. Animals

Twenty cyclic mixed-breed Nelore (*Bos indicus*) cows, ~3 y old, with ~500 kg and a body condition score ~3 (1-5 scale; [18]) were used. The cows were allocated to two farms located in the São Paulo State: Oliveira Farm (n = 10) (22°44'53.8" S, 48°37'11.3" W) and Areão Farm - ESALQ-USP (n = 10) (22° 43 31" S, 47° 38 57" W). Nutritional management consisted of pasture (*Urochloa brizantha*), mineral supplements, and *ad libitum* access to water.

2.4.2. Follicular aspiration

Transvaginal follicular aspirations were performed using an ultrasound device (Domed DM20v®, manufacturer, city, country) equipped with a 5.5 MHz micro-convex transducer coupled to an aspiration guide system (Ultra-Light® follicular aspiration guide, WTA, Cravinhos, Brazil). This system was designed to support an aspiration line (WTA), fitted with a 20G needle (WTA) at its tip, connected to a vacuum pump (WTA) previously calibrated to generate a negative pressure of 73 to 75 mmHg.

Prior to each aspiration session, caudal epidural anesthesia was induced with 5 mL of 2% lidocaine (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brazil). The perineal region and vulvar area were scrubbed, and the aspiration guide with the transducer was inserted transvaginally. Then, the ovaries were successively positioned transrectally against the vaginal wall over the transducer's face, ensuring that the targeted follicle was transected by the built-in line on the ultrasound image representing the projected needle path. The needle was then introduced into the ovarian stroma, taking care to avoid other follicles or luteal tissue [19]. Once the needle tip was centered within the follicle, follicular fluid was aspirated. This procedure was repeated for all visible follicles (> 3 mm) of both ovaries,

after which the system was flushed with a saline solution containing 5% sodium heparin. The tube containing the cumulus-oocyte complexes (COCs) was immediately sent to the laboratory for further processing.

2.4.3. Recovery and selection of cumulus-oocyte complexes

A laboratory room for the recovery and selection of COCs was established at the same farm where follicular aspirations were conducted. Upon arriving at the laboratory, the COCs were recovered using a mini oocyte filter (100 µm nylon mesh, WTA®; 25458), which retains the COCs while allowing the aspirated content to pass through. The filter was rinsed with sterile 0.9% NaCl solution using a 20 mL syringe to release the adhered COCs. The resulting effluent was transferred to a 90 mm Petri dish, where the COCs were identified and classified under stereomicroscopy (Nikon SMZ800, Tokyo, Japan) (STOJKOVIC et al., 2001). Only grades 1, 2, 3, and denuded COCs [20] were selected for *in vitro* maturation (IVM).

2.4.4. In vitro maturation

The selected COCs were washed in a buffered medium (Oocyte Wash®, BotuPharma) and transferred to individual 2 mL cryogenic tubes, each containing COCs from a single donor. The tubes were preloaded with 300 µL of maturation medium (Oocyte IVM®, BotuPharma) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum® (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) and 200 µL of silicone oil (Oil®, BotuPharma). The tubes were transported to the Laboratory of Ovarian Molecular Physiology (Department of Physiology, Institute of Biosciences, UNESP-Botucatu, São Paulo) in a temperature-

controlled oocyte and embryo carrier (WTA®) at 38.5 °C. Upon arrival, the COCs were incubated at 38.5 °C in a humidified atmosphere with 5.5% CO₂ for 24 hours.

2.4.5. *In vitro* fertilization

Following maturation, COCs were washed in buffered medium (Oocyte Wash®, BotuPharma) and transferred to 90 µL drops (25 COCs/drop) of fertilization medium (Culture IVF®, BotuPharma) in a 35 mm Petri dish, which were then covered with silicone oil (Oil® BotuPharma).

For *in vitro* fertilization (IVF), a cryopreserved semen sample from a Nelore bull (*Bos indicus*) was thawed at 37 °C for 30 s and then processed using a discontinuous gradient prepared with 0.4 mL of 45% v/v of Select Sperm® (BotuPharma) in Sperm-Wash® medium (BotuPharma) on top and 0.4 mL of 90% v/v of Select Sperm® in Sperm-Wash® at the bottom in a 1.5 mL conical tube. The preparation was centrifuged at 1360 g for 5 min (MiniSpin®, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The sperm pellet was resuspended in 0.8 mL of Sperm-Wash® medium (BotuPharma), centrifuged at 269 g for 3 min, and the supernatant was discarded. A pellet sample was analyzed in a Neubauer chamber to determine the sperm concentration. Then, COCs (20 per drop) and sperm (2×10^6 cells) were co-incubated at 38.5 °C in a humidified atmosphere with 5.5% CO₂ for 18 h.

2.4.6. *In vitro* culture

After 18 h IVF co-incubation, presumptive zygotes underwent denudation (removal of remaining cumulus cells) by gentle pipetting and were cultured in 90 µL of culture medium (Culture Embryo-IVC 1®, BotuPharma) supplemented with 2.5% Fetal Bovine Serum® (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) in 35 mm Petri dishes coated with

silicone oil (Oil®, BotuPharma). Structures were incubated at 38.5°C in a controlled gas atmosphere (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂).

On the 6th day of culture, the blastocyst rate was calculated, and embryos were classified morphologically as initial blastocyst (IB), expanded blastocyst (EB), or hatched blastocyst (HB). Embryo quality was assessed and scored as follows: 1 (excellent/good), 2 (fair), 3 (poor), and 4 (degenerated/dead) [20].

2.4.7. Packaging and transport of embryos

Embryos were first washed and maintained in drops of Embryo Transfer® medium (BotuPharma), designed to preserve viability during transport and transfer. Then, embryos were individually placed in 0.25 mL straws, filled with transfer medium, and properly sealed to ensure their integrity and viability.

After filling, the embryos were randomly assigned to two groups. Conventional (n = 98): embryos were maintained at 38°C in an electronic embryo transport device (Versatile Shipping Incubator #26237, WTA, Brazil). Isothermal Box (n = 109): embryos were stored in a Botuflex® isothermal box (BotuPharma, Brazil), containing 2 rigid artificial ice blocks (Gelotech®, Curitiba, Brazil) that had been preheated to 43°C, after which its internal temperature stabilized at 38°C (~30 min). Both devices underwent a simulated 6-hour transport, during which they were accompanied by the laboratory technician. After transport, the embryos were randomly assigned to *in vitro* reculture.

2.4.8. *In vitro* assessment of embryos after simulated transport

After simulated transport, embryos were removed from the straws and placed in a multi-well plate (Sigma-Aldrich), with each well containing 30 µL of culture medium

(Culture Embryo-IVC 1®, BotuPharma) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum® (Sigma-Aldrich). The plates were then incubated at 38.5°C in a controlled atmosphere (5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂). Hatching rates were assessed at 12, 24, and 36 h post-incubation.

2.5. Experiment 3: *In vivo* viability of bovine embryos following 6-hour simulated transport in the Botuflex® isothermal box.

This experiment aimed to investigate the effect of a 6-hour simulated transport in the Botuflex® isothermal box (Botupharma), which had been previously heated to 38 °C, on the *in vivo* viability of bovine embryos produced *in vitro*.

2.5.1. Animals

For Experiment 3, 10 cyclic crossbred Nelore (*B. indicus*) cows and 94 cyclic mixed-breed Nelore (*B. indicus*) cows were used as donor and recipients, respectively. The cows were ~3 years old, weighing ~500 kg, and with a body condition score of ~3 (on a 1 to 5 scale; [19]). The cows were allocated to a farm located in São Paulo State, Oliveira Farm (22°44'53.8" S, 48°37'11.3" W). Nutritional management included pasture (*Urochloa brizantha*), mineral supplementation, and *ad libitum* access to water.

2.5.2. Embryo production

The procedures for follicular aspiration, selection of COCs, *in vitro* maturation of COCs, *in vitro* fertilization, and embryo *in vitro* culture followed the same protocols outlined in Exp. 2. On the 7th day of culture, the blastocyst rate, embryo stage, and quality were assessed as described in the Exp. 2.

2.5.3. Packaging and transport of embryos

Embryos were handled and individually loaded into 0.25 mL straws, as described in Experiment 2. After loading, the embryos were randomly assigned to two groups. Conventional (n = 37): embryos were maintained at 38°C in an electronic embryo transport device (Versatile Shipping Incubator #26237, WTA), and Isothermal Box (n = 27): embryos were stored in a Botuflex® isothermal box (BotuPharma, Brazil) loaded with two rigid artificial ice blocks (Gelotech®, Curitiba, Brazil) that were preheated to 43 °C. Embryos were stored once the internal temperature of the isothermal box stabilized at 38°C. Both devices were then subjected to a simulated 6-hour transport, which included the travel period to the farm where the embryos were subsequently handled. After transport, the embryos were randomly assigned for direct embryo transfer into previously synchronized recipients.

2.5.4. Embryo Transfer

The recipients were synchronized using a three-step progesterone-based protocol, as described elsewhere (Baruselli et al., 2009): On Day zero (D0), a 1 g intravaginal progesterone implant Repro Neo®, was inserted, and estradiol benzoate (2.0 mg; Syncrogen®) was administered intramuscularly (IM). On D8, the progesterone implant was removed, and the following drugs were administered: prostaglandin F2α (0.530 mg; Inducio®), estradiol cypionate (1.0 mg; Cipion®), and equine chorionic gonadotropin (4000 IU; eCGen®). All drugs used in this protocol were from GlobalGen Vet Science (Jaboticabal, SP, Brazil).

Nine days after the last step of the protocol, the recipients were re-evaluated using rectal ultrasonography (DM20v®, Mindray, Campinas, SP, Brazil) to assess the presence, size, and vascularization of the corpus luteum. Cows with a corpus luteum deemed

suitable for embryo transfer [23] received epidural anesthesia with 2% lidocaine without vasoconstrictor (Lidovet®), followed by thorough cleaning of the rectum and vulva.

All embryo transfers were performed using a bovine embryo transfer gun (ET Gun, WTA®, Cravinhos, Brazil), fitted with a 0.25 mL transfer sheath (Bovine ET Sheath, WTA®). The assembled ET guns were covered with sanitary sheaths (IA/ET sanitary sheaths, IMV® Technologies, L'Aigle, France) to prevent external contamination and protect against direct light exposure.

To perform the inoovulation, the tip of the transfer gun was carefully inserted into the recipient's vaginal vestibule, guided into the vagina, and then advanced into the uterus via rectal palpation. The embryo was deposited at the tip of the uterine horn corresponding to the ovary bearing the corpus luteum.

Pregnancy diagnosis was performed by rectal ultrasonography (DM20v®, Mindray, Campinas, SP, Brazil) at 30 d post-IVF and reassessed at 60 d to detect early pregnancy loss.

2.6. Statistical analysis

Descriptive analyses were conducted using absolute and percentage frequencies for the categorical variables (stage of development and embryonic quality). Chi-square and Fisher's tests were performed to evaluate the association between the type of transport and the *in vitro* hatching rate, as well as the *in vivo* conception and early embryonic loss rates. Statistical differences were deemed significant for $P \leq 0.05$.

Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier curve to analyze blastocyst survival over incubation time and hatching success. Differences between transport types were assessed using the Log-Rank Test (Mantel-Cox). The Hazard Ratio

(HR) was calculated using the Mantel-Haenszel method, with a 95% confidence interval (95% CI).

3. Results

Experiment 1: Isothermal box validation

After sealing, the isothermal box loaded with two rigid ice blocks preheated at 43 °C, the average internal temperature was ~29 °C. Then, after ~30 minutes, the internal temperature increased to 38 °C. Subsequently, the internal temperature gradually declined at a mean rate of 1.17 °C/min, reaching ~approximately 31 °C after 6 hours (Fig. 3).

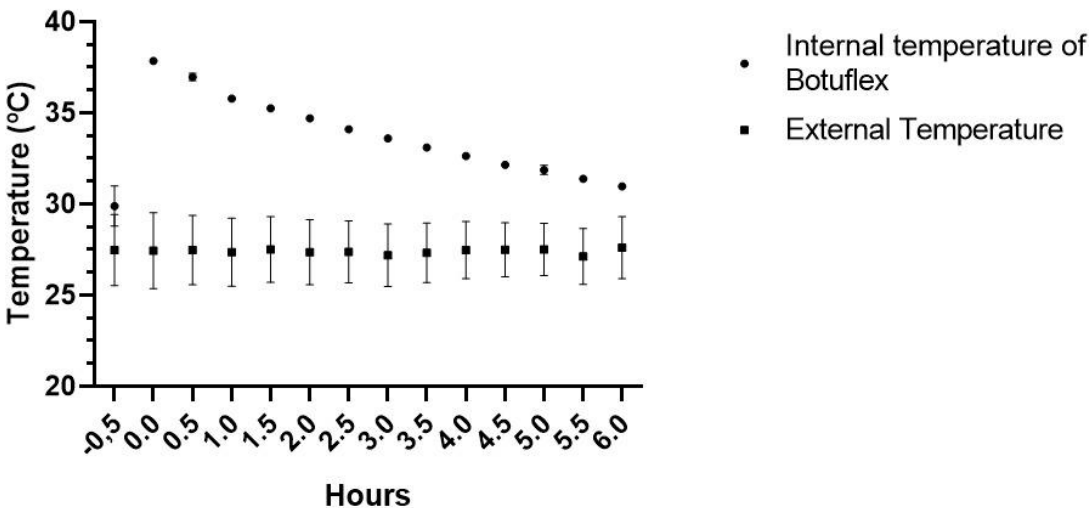


Figure 3. Mean ($\pm$ SEM) values of the internal and external temperatures of the isothermal box (n = 6) during the 6-hour simulated transport. Hour -0.5 refers to the moment when the rigid ice packs were placed inside and the box monitoring began, while hour 0 refers to the moment when the mean internal temperature reached 38 °C

Global *in vitro* embryo production

In this study, 271 embryos were produced from 716 recovered COCs that met the selection criteria (Blastocyst rate = 37,0%), of which 207 were recultured *in vitro* after transport, while the remaining (n = 64) were assigned to Experiment 3.

Experiment 2: Embryo transport and *in vitro* reculture

The embryos were randomly distributed among the experimental groups (Table 1). Before the simulated transport, the embryos predominantly exhibited excellent or good morphological quality (70%). However, embryos of fair (23.68%) and poor (6.28%) quality were also observed (Table 1).

Table 1. Distribution (%) of embryos according to the developmental stage (DS) and quality (EQ) across experimental groups (transportation method).

Group	Developmental stage	Embryo Quality			Total
		1	2	3	
Conventional	iB	2	3	3	8
	B	18	8	3	29
	XB	53	8	0	61
	Total	73	19	6	98
Isothermal Box	iB	2	2	1	5
	B	20	14	4	38
	XB	50	14	2	66
	Total	72	30	7	109
Total		145 (70%)	49 (23%)	13 (7%)	207

iB: initial blastocyst; B: blastocyst; XB: expanded blastocyst. Embryo quality: 1: excellent/good; 2: fair; 3: poor.

The embryonic hatching rate, a key parameter for evaluating the effects of experimental treatments, was assessed after simulated transport through *in vitro* recultivation. The transportation method did not significantly affect hatching rates ($P = 0.8937$; Table 2). Similarly, the percentages of unhatched and degenerated embryos after recultivation were not influenced by the transportation method ($P = 0.8937$; Table 2).

343

344 **Table 2.** Distribution of blastocysts according to the developmental stage after 36 hours
345 of recultivation across experimental groups (transportation method).

Tipo de transporte	Stage of embryonic development			
	Blastocysts	Unhatched	Hatched	Degenerated
Conventional	n	n (%)	n (%)	n (%)
Isothermal Box	98	28 (28,57)	45 (45,92)	25 (25,51)
	109	30 (27,52)	48 (44,04)	31 (28,44)

346 * The percentages were calculated based on the total number of embryos recultivated (n = 207).
347

348 To explore potential temporal effects, embryos were monitored at 12, 24, and 36-
349 hour intervals after the start of the recultivation period. No significant differences in
350 hatching rates were observed at any of these times (P = 0.4821; Table 3).

351 **Table 3.** Distribution of hatched blastocysts over the reincubation time among the
352 experimental groups.

Group	Hatched blastocysts		
	12 h	24 h	36 h
Conventional	n (%)	n (%)	n (%)
Isothermal Box	14 (31.11)	21 (46.67)	10 (22.22)
	16 (33.33)	17(35.42)	15 (31.25)

353 * The percentages were calculated based on the total number of embryos recultivated (n = 207).
354

The comparison of survival curves for hatching and embryonic survival rates during reincubation, analyzed using the Kaplan-Meier method, is shown in Figs. 4 and 5, respectively. No differences in hatching or survival rates were observed between the two groups across the monitored intervals ($P = 0.76$ and $P = 0.77$, respectively).

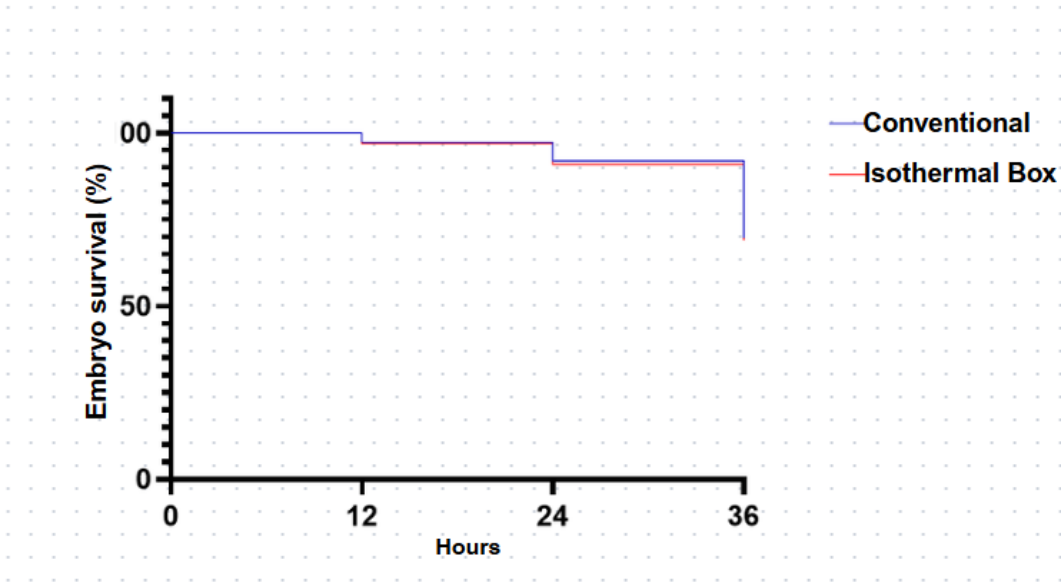


Figure 4. Kaplan-Meier survival analysis of embryonic hatching during the incubation time in the experimental groups (Conventional and Isothermal box).

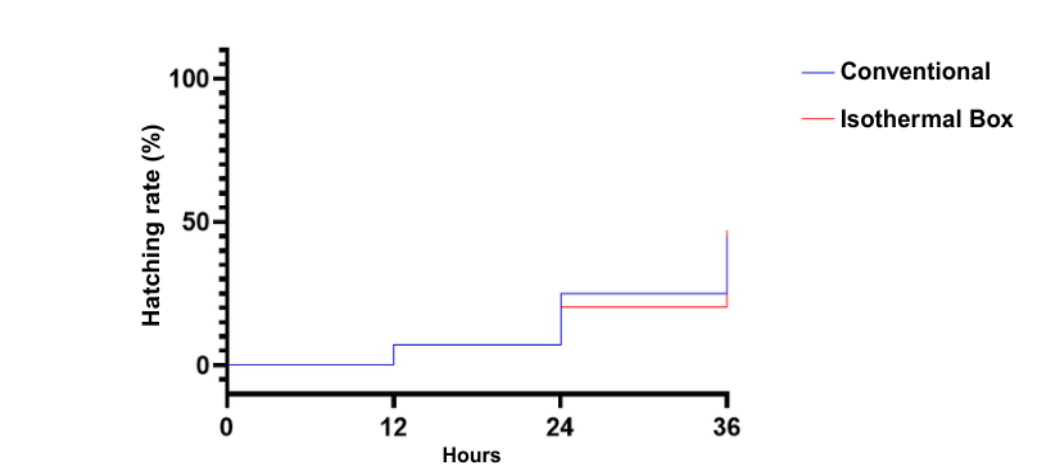


Figure 5. Kaplan-Meier survival analysis of embryonic hatching during the incubation period in the experimental groups.

Experiment 3: Embryo transfer

For Experiment 3, 64 embryos, graded as 1 (n = 44), 2 (n = 12) and 3 (n = 8), were transferred into previously synchronized recipients after transport using either the conventional (n = 37) or isothermal boxes (n = 27), aiming to assess the conception rate at 30 d of gestation and the early gestational loss rate at 60 d of gestation. The transport method had no significant effect on conception rates at 30 and 60 days (P = 0.8809 and P = 0.5735, respectively; Table 4).

Table 4. Distribution of conception rate and early gestational loss after embryo transfer across the experimental groups.

Group	Embryos n	30-d conception rate n (%)	60-d conception rate n (%)
Conventional	37	13 (35,14)	12 (32,43)
Isothermal box	27	9 (33,33)	7 (25,93)

* The percentages were calculated based on the total number of embryos transferred for group.

4. Discussion

The present research demonstrated that the Botuflex® isothermal box is an effective, low-cost, and energy-independent alternative for the transportation of IVP bovine embryos, maintaining their viability during a simulated 6-hour transport. The results obtained were comparable to those of conventional portable incubators [22], both in terms of embryonic development and pregnancy outcomes [12,13]. These findings align with the growing demand for accessible reproductive technologies in resource-limited environments, while addressing critical gaps in embryo transport methodologies, a challenge particularly relevant in rural and remote areas.

In terms of thermal stability, the transport system using the isothermal box maintained the temperature within a safe range for the embryos, varying from 38°C to 30°C. This result corroborates previous findings suggesting that bovine embryos can tolerate subphysiological temperatures (30 - 38 °C) for up to 12 h without showing significant impacts on embryonic development [23]. This resilience can be explained by the metabolic adaptability of blastocysts, which, when exposed to moderately low temperatures, exhibit a reduced metabolic rate, thereby minimizing oxidative stress and energy depletion while preserving cellular integrity [24,25]. Similar results were also observed in equines, where embryos kept for 24 h at room temperature (25 °C) maintained their morphological integrity [26]. Ramos et al. (2006) also reported that bovine embryos transported at 35°C for 6–12 hours maintained high re-expansion and hatching rates, corroborating the physiological relevance of the thermal range observed in the present study [27]. Moreover, the similarity in pregnancy rates at 30 and 60 days ($P = 0.8809$) reinforces the applicability of the isothermal box transport system in commercial programs. This finding is consistent with research in human IVF, where non-electric transport devices have proven successful in mitigating factors such as mechanical stress and temperature fluctuations, which are critical for early embryonic survival [28].

The isothermal box group also stands out for its independence from electricity and lower maintenance requirements—features that align with FAO recommendations for the implementation of assisted reproductive technologies in low-resource regions [29]. In regions with limited access to electrical infrastructure, such as remote areas, utilizing low-cost, energy-efficient systems can significantly improve reproductive efficiency and deliver superior genetic material. Similar strategies have been successfully adopted in

other contexts, such as in buffaloes, where low-cost embryo transport systems have helped improve reproductive efficiency without compromising outcomes [30]. Furthermore, the simplicity of the system reduces operational errors, a common issue in field environments where technical training may be limited [31].

Despite the promising results, this study presents some limitations. The simulated transport was restricted to a 6-hour period under controlled environmental conditions, which does not fully reflect the variability encountered in field scenarios. Previous studies have shown that factors such as prolonged exposure time and environmental extremes particularly high or low ambient temperatures can significantly affect embryo viability during storage or transport [32]. In murine models, for example, embryos exposed to hypothermic conditions (25°C) for 24 hours exhibited increased levels of apoptosis and developmental arrest, emphasizing that both the duration and temperature of exposure are critical determinants of post-transport viability [33]. Therefore, future investigations should assess the efficacy of isothermal transport systems under more prolonged and variable environmental conditions to ensure robustness and applicability under real-world settings. Therefore, future studies should explore the performance of the isothermal box transport system under adverse climatic conditions, where thermal fluctuations may be more substantial and pose greater challenges to maintaining embryonic viability.

In conclusion, the Botuflex® isothermal box represents a viable and low-cost alternative to conventional systems used for the transport of bovine embryos, particularly in regions with structural limitations. By maintaining thermal stability within physiologically tolerable ranges, this technology supports the global scalability of in vitro production (IVP) technologies, advancing genetic improvement programs in extensive cattle production systems. Future research should assess the system's adaptability to

longer transport durations and diverse environmental contexts, thereby expanding the potential application of this innovative technology.

5. Conclusion

The present study demonstrates that the Botuflex® isothermal box, a passive and energy-independent system, effectively maintains the viability and developmental competence of in vitro-produced bovine embryos during 6-hour transport, yielding results comparable to those of conventional electric incubators. The absence of significant differences in hatching rates, pregnancy rates at 30 and 60 days, and early embryonic loss highlights the robustness of this method under controlled conditions. These findings are consistent with previous reports on bovine embryo resilience to subphysiological temperatures during short-term storage and validate the potential of this system as a practical alternative for regions with limited infrastructure.

The gradual temperature drop observed in the isothermal box transport system (from 38°C to 30°C) remained within the documented thermotolerance range for bovine blastocysts, which can temporarily adapt to metabolic stress without compromising cellular integrity. This adaptability reflects findings in equine and caprine models, where passive cooling systems preserved embryonic viability by minimizing oxidative damage and mechanical stress.

In conclusion, the Botuflex® isothermal box offers a viable and low-cost solution for short-term transport of bovine embryos, facilitating the dissemination of in vitro production (IVP) technologies and genetic improvement in extensive livestock production systems.

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-](https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000800012)
564 [35982006000800012](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