



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BÁRBARA GOMES RODRIGUES NOGUEIRA**

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES *IN VITRO***

**BÁRBARA GOMES RODRIGUES NOGUEIRA**

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caliê Castilho

636.089  
N778f

Nogueira, Bárbara Gomes Rodrigues.  
Fatores que influenciam a produção comercial de embriões *in vitro* / Bárbara Gomes Rodrigues Nogueira – Presidente Prudente, 2018.  
80f. : il

Defesa (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.  
Bibliografia.  
Orientador: Caliê Castilho

1. Blastocisto. 2. *Bos indicus*. 3. *Bos taurus*. 4. Clivagem.  
5. Prenhez. 6. Sazonalidade. I. Título.

**BÁRBARA GOMES RODRIGUES NOGUEIRA**

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES *IN VITRO***

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 24 de maio 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Orientadora Caliê Castilho  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yeda Fumie Watanabe  
Pesquisadora independente  
Cravinhos-SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Zaneti Puelker  
Empresa PROGEST – Biotecnologia de Reprodução Animal  
Sorocaba-SP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Angela e Militão, que me aconselham e me apoiam em todas as decisões, não medindo esforços para me ver feliz e realizada.

Ao meu maravilhoso marido William, que está sempre ao meu lado em cada passo, me incentivando e dando forças com muito carinho e compreensão.

Ao meu lindo e gostoso filho Bernardo, que veio no decorrer do mestrado, nada planejado, porém muito amado. Sua vinda só serviu para me dar mais motivação e alegria.

Aos meus irmãos Neto e Virgínia, que estão sempre presentes no meu dia a dia, me alegrando e apoiando. Como é bom ter vocês na minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a finalização de mais uma etapa em minha vida primeiramente à Deus, que me proporciona sabedoria, fé e saúde, sem a luz divina nada faria, nada seria.

A Dr<sup>a</sup> Caliê Castilho, que além de me orientar maravilhosamente bem, foi uma grande amiga no decorrer desses dois anos, me compreendendo e apoiando.

A professora e amiga Lilian Francisco Arantes de Souza, que me auxiliou muito no decorrer e finalização deste projeto, sua amizade é preciosa.

Aos técnicos de campo e laboratório por ceder os dados e realizarem serviços com excelência contribuindo com a pesquisa.

Ultrapassar obstáculos é o  
prazer pleno da existência, sejam eles de tipo  
material, como nas ações e nos exercícios,  
sejam de tipo espiritual, como nos estudos e  
nas investigações. A luta contra as  
adversidades e a vitória torna o homem feliz.  
Se lhe faltar oportunidade, irá criá-la como  
puder.

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

### Fatores que influenciam a produção comercial de embriões *in vitro*

O Brasil responde por quase 70% da produção mundial de embriões *in vitro*. A técnica de OPU-PIVE apresenta vantagens em relação aos outros programas de reprodução, pois proporciona um avanço acelerado do melhoramento genético do rebanho nacional, gerando maior número de animais superiores devido à pressão de seleção, além de possibilitar o uso de fêmeas de idades variadas, em qualquer fase do ciclo estral, inclusive as que possuem problemas reprodutivos adquiridos. Aliado ao uso de sêmen sexado, apresenta benefícios, principalmente para os produtores de leite, pois conseguem ter uma maior proporção de fêmeas no rebanho, tornando o uso da PIVE viável em larga escala. Porém, a técnica apresenta variabilidade na produção de blastocistos e na taxa de prenhez. Dessa forma, verificar e demonstrar os fatores que influenciam nos resultados obtidos por um laboratório comercial se mostra necessário, pois estas empresas englobam diferentes variáveis como: raças, localidades, manejos, sazonalidades e assim retratam a realidade do campo. Com isso, o presente estudo objetivou verificar os fatores que influenciam a produção de embrião *in vitro* (PIVE) e a taxa de prenhez utilizando dados de um Laboratório comercial. Para análise de PIVE, dados do ano de 2014 a 2016, referentes à 776 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) de fêmeas bovinas adultas doadoras de oócitos para fins comerciais das raças Nelore (n=83), Girolando (n=73), Brangus (n=49), Holandesa (n=10) e Senepol (n=10), procedentes de diferentes localidades, foram avaliados. Foram analisadas a influência de cinco variáveis: raça da doadora, frequência de aspiração por doadora, tipo de sêmen (sexado vs convencional), sazonalidade (primavera/verão vs outono/inverno) e grupo genético da doadora (*Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e cruzamento) sobre as taxas de: oócitos viáveis, clivagem e produção de blastocisto. A produção de embriões *in vitro* seguiu os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório. Já para análise da taxa de prenhez, dados de 20.297 inovulações realizadas entre novembro de 2009 e abril de 2016 foram avaliados. A influência de cinco variáveis: sazonalidade (primavera/verão vs outono/inverno), tipo de sêmen (sexado vs convencional), estágio embrionário, raça da doadora e da receptora sobre a taxa de prenhez, foram analisadas. A produção *in vitro* dos embriões foi realizada por apenas um técnico de laboratório e as inovulações por dois técnicos igualmente capacitados. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC) empregando-se o Teste Qui-quadrado a um nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). A raça Girolando apresentou maior taxa de blastocistos quando comparada com as demais raças. Doadoras aspiradas entre 9 e 17 vezes resultaram em maior taxa de clivagem e de blastocistos em comparação as aspiradas de 2 a 8 vezes ( $p = 0,0001$ ). Ao avaliar as taxas de clivagem e de blastocisto de acordo com o tipo de sêmen, estas foram maiores quando utilizado o sêmen sexado em comparação ao sêmen convencional. A sazonalidade influenciou a taxa de oócitos viáveis, sendo melhor na primavera/verão ( $p = 0,0001$ ), no entanto, sem afetar a taxa de clivagem e de blastocisto. Quando comparado o grupo genético das doadoras, obteve-se uma superioridade do *Bos indicus*, representado pela raça Nelore, para taxa de oócitos viáveis e blastocisto, enquanto que o *Bos taurus* apresentou os menores valores. Para as análises dos dados de inovulações, obtivemos: superioridade na taxa de prenhez no período primavera/verão quando comparada com outono/inverno,

independente da raça da doadora assim como quando utilizado o sêmen convencional nas fertilizações *in vitro*. Ao transferir embriões em estágio de blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocisto a taxa de prenhez é maior ( $p=0,0046$ ), quando comparada à mórula e blastocisto inicial. As doadoras das raças Brangus, Bonsmara e Gir apresentaram as maiores taxas e as Holandesas e Senepol as menores ( $p<0,0001$ ). As receptoras com maior taxa de prenhez são das raças Bonsmara, Angus e Nelore. Ao agrupar a raça com a sazonalidade de inovulação, doadoras da raça Nelore e Brangus tem maiores taxas de prenhez na primavera/verão, enquanto que as raças leiteiras Holandesa e Gir se expressam melhor no outono/inverno. Para as receptoras, seguiu o mesmo padrão, as raças Nelore e europeu de corte apresentaram maiores taxas na primavera/verão e Holandesa, no outono/inverno. Concluímos com a realização deste estudo retrospectivo que: na PIVE, as doadoras da raça Girolando seguida pelas da raça Nelore exibiram o melhor desempenho na produção de blastocistos; esta produção aliada ao sêmen sexado demonstram que pode ser utilizado com sucesso em programa comercial, sobretudo na raça Girolando. A campo, as maiores taxas de prenhez se concentram na estação primavera/verão; os embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento resultam em mais prenhez; o uso de sêmen convencional se mostrou superior que o sexado; e a raça da doadora e receptora é fator preponderante nos resultados. Desta forma, torna-se possível a obtenção de resultados satisfatórios comercialmente com a adaptação do laboratório às variáveis analisadas.

**Palavras-chave:** Blastocisto; *Bos indicus*; *Bos taurus*; Clivagem; Prenhez; Sazonalidade.

## ABSTRACT

### Factors influencing the commercial production of embryos *in vitro*

Brazil accounts for almost 70% of the worldwide production of *in vitro* embryos. The OPU-IVP (ovum pick-up/*in vitro* production) technique has advantages over other breeding programs, since it provides an accelerated advance of the genetic improvement of the national herd, generating superior animals due to the selection pressure, besides allowing the use of females of different ages, at any stage of the estrous cycle, including those with acquired reproductive problems. Combined with the use of sexed semen, it has benefits, especially for dairy farmers, since they can have a higher proportion of females in the herd, making the use of IVP viable on a large scale. However, the technique presents variability in the production of blastocysts and in the pregnancy rate. Thus, to verify and demonstrate the factors that influence the results obtained by a commercial laboratory is necessary, since these companies include different variables such as: breeds, localities, management, seasonality and thus portray the reality of the field. Thus, the present study aimed to verify the factors that influence *in vitro* embryo production (IVP) and the pregnancy rate using data from a commercial laboratory. For analysis of IVP, data from the year 2014 to 2016, referring to the 776 ultrasound guided follicular aspiration (OPU) sessions of oocyte donor adult females for commercial purposes of the Nelore (n=83), Girolando (n=73), Brangus (n = 49), Holstein (n=10) and Senepol (n=10) from different localities were evaluated. The influence of five variables: donor breed, donor aspiration frequency, semen type (sexado vs conventional), seasonality (spring/summer vs. autumn/winter) and donor genetic group (*Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* and crossover) on the rates of: viable oocytes, cleavage and blastocyst production. *In vitro* embryo production followed the protocols already established by the Laboratory. As for the analysis of the pregnancy rate, data from 20,297 innovations carried out between November 2009 and April 2016 were evaluated. The influence of five variables: seasonality (spring/summer vs. autumn/winter), type of semen (sexed vs conventional), embryonic stage, donor and recipient breed on pregnancy rate were analyzed. The *in vitro* production of the embryos was performed by only one laboratory technician and the innovations by two equally trained technicians. Statistical analysis of the data was performed using the Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC) software using the chi-square test at a 5% level of significance ( $p < 0.05$ ). The Girolando breed had a higher blastocyst rate when compared to the other breeds. Donors aspirated between 9 and 17 times resulted in a higher rate of cleavage and of blastocysts compared to those aspirated 2 to 8 times ( $p = 0.0001$ ). When evaluating the rates of cleavage and blastocyst according to the type of semen, these were higher when using semen sexed compared to conventional semen. Seasonality influenced the rate of viable oocytes, being better in spring / summer ( $p = 0.0001$ ), however, without affecting the rate of cleavage and blastocyst. When comparing the genetic group of the donors, a superiority of the *Bos indicus*, represented by the Nelore breed, was obtained for viable oocytes and blastocyst rates, while *Bos taurus* presented the lowest values. For the analysis of the data of innovations, we obtained: superiority in the pregnancy rate in the spring/summer period when compared to autumn/winter, regardless of the breed of the donor as well as when the conventional semen was used in the *in vitro* fertilizations. When transferring embryos in expanded blastocyst stage, blastocyst and blastocyst the pregnancy rate is higher ( $p = 0.0046$ ). Donors

from the Brangus, Bonsmara and Gir breeds had the highest rates and the lowest Holstein and Senepol breeds ( $p < 0.0001$ ). The recipients with the highest pregnancy rate are Bonsmara, Angus and Nelore. By grouping the breed with seasonality of innovation, Nelore and Brangus donors have higher pregnancy rates in the spring/summer, while the Holstein and Gir dairy breeds express themselves better in the fall/winter. For the recipients, it followed the same pattern, the Nelore and European breeds showed higher rates in spring/summer and Holstein in autumn/winter. We conclude with the accomplishment of this retrospective study that: in the IVP, the Girolando donors followed by the Nelore breed showed the best performance in the production of blastocysts; this production associate to sexed semen demonstrates that it can be used successfully in a commercial program, especially in the Girolando breed. In the field, the highest pregnancy rates are concentrated in the spring/summer season; embryos at a more advanced stage of development result in more pregnancy; the use of conventional semen was superior to sexed; and the donor and recipient breed is a preponderant factor in the results. In this way, it is possible to obtain satisfactory results with the adequacy of the database to the analyzed variables.

**Key-words:** Blastocyst; *Bos indicus*; *Bos taurus*; Cleavage; Pregnancy; Seasonality.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO II.....</b>	<b>29</b>
	<b>ANEXO 1 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO 2 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>59</b>

1 **Desempenho superior da raça Girolando com sêmen sexado na produção de**  
2 **embriões *in vitro* em programa comercial**

3  
4 Bárbara Gomes Rodrigues Nogueira<sup>a</sup>, Lilian Francisco Arantes de Souza<sup>a</sup>, Ines Cristina  
5 Giometti<sup>a</sup>, Sheila Merlo Garcia Firetti<sup>a</sup>, Caliê Castilho<sup>a\*</sup>

6  
7 <sup>a</sup> Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente (UNOESTE), SP, Brasil

8  
9 \* Corresponding author. Tel.: +55 18 32292077; Fax: +55 18 3229-2080.

10 E-mail addresses: [calie@unoeste.br](mailto:calie@unoeste.br) Postal address: Rodovia Raposo Tavares, Km  
11 572 - Bairro Limoeiro Presidente Prudente, SP- Brasil- CEP:19067-175

12  
13 **RESUMO**

14 Objetivou-se com o presente trabalho verificar os fatores que influenciam a produção de  
15 embrião *in vitro* (PIVE), utilizando dados de um Laboratório comercial brasileiro.  
16 Foram analisados dados do ano de 2014 a 2016, referentes a 776 sessões de aspiração  
17 folicular guiada por ultrassom (OPU) de fêmeas bovinas adultas das raças: Nelore  
18 (n=83), Girolando (n=73), Brangus (n=49), HPB (n=10) e Senepol (n=10). Analisou-se  
19 a influência de cinco variáveis: raça, grupo genético, frequência de aspiração, tipo de  
20 sêmen (sexado/convencional) e sazonalidade (primavera/verão vs outono/inverno) sobre  
21 as variáveis: oócitos viáveis, clivagem e produção de blastocisto. Os protocolos para a  
22 produção de embriões *in vitro* (PIV) seguiram a rotina estabelecida pelo laboratório  
23 parceiro do presente estudo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o  
24 SAS, empregando-se o Teste Qui-quadrado. A doadora da raça Girolando produziu  
25 mais blastocistos (p<0,0001) que as demais raças. As taxas de clivagem e blastocisto  
26 foram maiores (p<0,0001) com sêmen sexado em relação ao convencional. Em  
27 conclusão, a produção *in vitro* de embriões bovinos é influenciada pelos fatores  
28 analisados e para nossa surpresa o sêmen sexado apresentou maior taxa de blastocisto  
29 comparada ao convencional. A raça e o grupamento sanguíneo exercem influência nos  
30 resultados, sendo nas doadoras da raça Girolando e no grupamento *Bos indicus* as  
31 melhores taxas de blastocistos.

32 Palavras-chave: Blastocisto, *Bos indicus*, vaca Girolando, aspiração folicular guiada por  
33 ultrassom

34 **ABSTRACT**

35 The aim of the present study was to verify the factors that influence *in vitro* embryo  
36 production (IVP) using data from a Brazilian commercial laboratory. Data were  
37 obtained from 2014 to 2016 for 776 sessions of ovum pick-up (OPU) of adult bovine  
38 females of the breeds: Nelore (n=83), Girolando (n=73), Brangus (n=49), BPH (n=10)  
39 and Senepol (n=10). Therefore, we analyzed the influence of five variables: race and  
40 genetic group of the donor, frequency of aspiration, type of semen (sexado vs.  
41 conventional), seasonality (spring/summer vs autumn/winter) on the variables: viable  
42 oocytes, cleavage and blastocyst production. Protocols for *in vitro* embryo production  
43 (IVP) are an example of independent study of the present study. The statistical analysis  
44 of the data was performed using the SAS, using the Chi-square test. The Girolando  
45 breed presented a higher rate of blastocysts ( $p<0.0001$ ) when compared to other breeds.  
46 The rates of cleavage and production of blastocyst are higher ( $p<0.0001$ ) for sexed  
47 sperm than conventional. In conclusion, the Girolando breeds, followed by the Nelore  
48 breeds exhibited the best performance in the production of blastocysts; Blastocyst  
49 production with sorted sperm showed that sexed and frozen bovine sperm can be used  
50 successfully in an IVP commercial program, especially in the Girolando breed.

51 Keywords: Blastocyst; *Bos indicus*; Girolando breed, ovum pick-up

52

53

## INTRODUÇÃO

54

55 O início dos trabalhos comerciais de OPU-PIVE no Brasil ocorreu com a  
56 implantação do primeiro laboratório no ano de 1998. Estas técnicas foram alavancadas  
57 pelas exportações de carne bovina que tiveram impulso a partir de 2002, exigindo dos  
58 produtores maior eficiência produtiva para atender a demanda mundial por carne.  
59 Devido ao rebanho da raça Nelore ter se adaptado extraordinariamente a OPU-PIVE,  
60 rapidamente seu uso foi difundido entre os pecuaristas, chegando a representar mais de  
61 80% do total de embriões transferidos (Viana, 2008). Desde então o Brasil é líder em  
62 embriões produzidos *in vitro* (PIVE) (Perry, 2016).

63

64

65

66

67

68

Quando a PIVE é utilizada em âmbito comercial, aliada à técnica de punção folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* - OPU) para obtenção de oócitos, consegue-se maximizar o potencial produtivo dos rebanhos, aumentar o número de descendentes, diminuir o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético animal (Varago et al., 2008), possibilitando inclusive o uso de fêmeas com patologias reprodutivas adquiridas (Bueno e Beltran, 2008). Assim, esta técnica vem apresentando

69 avanços consideráveis e vantagens em comparação a outros programas de reprodução,  
70 permitindo sua aplicação em larga escala e a exportação desse modelo para vários  
71 países latino-americanos e de outros continentes (Bols et al., 2012).

72 Apesar do grande potencial e evolução da PIVE nos últimos anos, esta  
73 biotécnica apresenta alguns fatores limitantes, sendo a variabilidade nos resultados  
74 quanto as taxas de blastocisto (10 a 40%) (Lonergan and Fair, 2008; Rizos et al., 2008)  
75 e prenhez (30 a 50%, Trigal et al., 2012; Gonella et al., 2013) um dos mais relevantes e  
76 que influi diretamente no sucesso comercial da técnica.

77 Os meios de cultivo *in vitro* melhoraram significativamente nos últimos 15 anos  
78 (Blondin, 2015), as condições gerais de produção embrionária estão bem estabelecidas,  
79 porém ainda existe variabilidade nos resultados, o que pode ser creditado à origem dos  
80 oócitos.

81 Assim, em trabalhos comerciais a utilização de fêmeas doadoras de oócitos de  
82 diferentes raças e origens, com manejos distintos, bem como diferentes protocolos e  
83 técnicos, evidencia a necessidade de pesquisas que retratem a realidade da produção  
84 comercial no Brasil, contribuindo com a melhoria ou regularidade dos índices finais.

85 Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi apontar os principais fatores que  
86 influenciam a produção comercial de embrião *in vitro*.

87

88

## MATERIAL E MÉTODOS

89

90 O presente estudo foi conduzido utilizando dados retrospectivos fornecidos por  
91 um Laboratório Comercial de produção *in vitro* de embriões, localizado no município  
92 de Presidente Prudente, oeste do Estado de São Paulo (Latitude 22° 07' S e Longitude  
93 51° 23'). Aprovado pelo Comitê de Ética da UNOESTE sob o número de protocolo  
94 4179.

95 Foram utilizados dados do ano de 2014 a 2016, referentes a 225 fêmeas bovinas,  
96 adultas, doadoras de oócitos das raças: Nelore, Girolando, Brangus, Holandesa e  
97 Senepol procedentes de diferentes localidades. Portanto, os animais eram mantidos sob  
98 diferentes condições de manejo de acordo com a rotina estabelecida em cada  
99 propriedade e foram aspirados no mínimo 2 e no máximo 17 vezes. A grande maioria  
100 dos atendimentos se restringiam em um raio 200 km abrangendo a região oeste do  
101 estado de São Paulo, leste do Mato Grosso do Sul e noroeste do Paraná.

102 As 225 fêmeas doadoras de oócitos das raças Nelore (n=83), Girolando (n=73),  
103 Brangus (n=49), Holandesa (n=10) e Senepol (n=10) foram submetidas a um total de  
104 776 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).

105 As aspirações foliculares foram realizadas na propriedade de origem dos  
106 animais, onde os complexos cumulus-oócitos (COC's) foram classificados de acordo  
107 com a presença de células do cumulus e aspecto do ooplasma (Seneda et al., 2001).  
108 Após seleção apenas oócitos atrésicos foram descartados e o restante depositados em  
109 criotubos contendo meio de maturação. Esses criotubos eram gaseificados utilizando-se  
110 uma mistura padrão de gases (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>) e enviados ao laboratório em  
111 incubadoras de transporte de oócitos (WTA<sup>®</sup>, Cravinhos, Brasil) com temperatura  
112 controlada (37° C).

113 No laboratório os criotubos eram destampados e colocados em incubadoras à 5%  
114 de CO<sub>2</sub> em ar e em temperatura de 38,5°C.

115 Os procedimentos *in vitro*, ou seja, MIV (maturação *in vitro*), FIV (fertilização  
116 *in vitro*) e CIV (cultivo *in vitro*), foram realizados de acordo com Castilho et al., (2007)  
117 adaptado pelo laboratório analisado.

118 A taxa de clivagem, ou seja, embriões com mais de 2 células, foi avaliada 48  
119 horas após a fecundação e o desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto) no  
120 sétimo dia.

121 Foi analisada a influência de cinco variáveis: raça da doadora, frequência de  
122 aspiração por doadora, tipo de sêmen (sexado *vs* convencional), sazonalidade  
123 (primavera/verão *vs* outono/inverno) e grupo genético da doadora (*Bos taurus taurus*,  
124 *Bos taurus indicus* e cruzamento) sobre as taxas de: oócitos viáveis, clivagem, produção  
125 de blastocisto e blastocisto por sessão de OPU.

126 O efeito da sazonalidade foi avaliado dividindo os procedimentos de aspiração  
127 folicular em dois grupos de acordo com as datas em que foram realizados. Grupo  
128 Primavera/Verão, fêmeas aspiradas entre o dia 22 de setembro e 20 de março e grupo  
129 Outono/Inverno aspiradas entre 21 de março e 21 de setembro.

130 Para verificar a influência do número de vezes em que a doadora foi aspirada,  
131 foram excluídas as fêmeas aspiradas apenas uma vez, estabelecendo as seguintes faixas:  
132 2 a 8 sessões e 9 a 17 sessões de OPU.

133 A influência do grupo genético foi analisada agrupando as doadoras conforme a  
134 raça: *Bos taurus* (Holandesa e Senepol), *Bos indicus* (Nelore), *Bos taurus* x *Bos indicus*  
135 (Brangus e Girolando).

136 A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa computacional  
 137 Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC) empregando-se o  
 138 Teste Qui-quadrado, utilizando nível de significância de 5%.

139

140

141

## RESULTADOS

142

143 Houve efeito da raça da doadora sobre as variáveis: oócitos viáveis, clivagem e  
 144 produção de blastocistos (Tab. 1).

145

146 O percentual de oócitos viáveis foi maior nas raças Nelore, Brangus e Holandesa  
 147 ( $p < 0.0001$ ). No entanto, a raça Girolando apresentou a maior ( $p < 0.0001$ ) taxa de  
 148 clivagem e blastocisto.

Tabela 1: Taxas de recuperação, Óocitos viáveis, clivagem, blastocistos e blastocistos por sessão de OPU, de acordo com a raça das doadoras utilizadas na produção *in vitro* comercial de embriões bovinos.

	Nelore (n=83)	Girolando (n=73)	Brangus (n=49)	Holandesa (n=20)	Senepol (n=10)	Valor de p
Óocitos recuperados	34,28 (7268/212)	31,02 (10764/347)	36,76 (5440/148)	19,53 (840/43)	28,86 (1414/49)	0,0051
% Óocitos viáveis	74,34 (5403/7268)	66,07 (7112/10764)	75,44 (4104/5440)	67,38 (566/840)	60,75 (859/1414)	0,0001
% Clivagem	77,61 (4193/5403)	87,54 (6226/7112)	57,38 (2355/4104)	66,61 (377/566)	56,23 (483/859)	0,0001
% Blastocistos	30,74 (1661/5403)	32,83 (2335/7112)	17,23 (707/4104)	21,55 (122/566)	14,44 (124/859)	0,0001
Blastocisto /OPU	7,83 (1661/212)	6,73 (2335/347)	4,78 (707/148)	2,84 (122/43)	2,53 (124/49)	0,0001

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo Teste de Qui-quadrado a 5%.

149

150

151 As taxas de clivagem e blastocisto foram maiores ( $p < 0.0001$ ) em doadoras  
 152 aspiradas com maior frequência (9 a 17 vezes), sem, no entanto, afetar a taxa de oócitos  
 153 viáveis (Tab. 2).

154

155

156  
157  
158  
159

Tabela 2: Taxas de oócitos viáveis, clivagem e blastocisto de acordo com a frequência de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) de doadoras, independente da raça, utilizadas na produção *in vitro* comercial de embriões bovinos.

	2 a 8 OPU (n=590)	9 a 17 OPU (n=183)	Valor de p
% Oócitos Viáveis	70,08 (13180/18805)	70,36 (4829/6863)	0,6699
% Clivagem	74,50 <sup>b</sup> (9819/13180)	78,28 <sup>a</sup> (3780/4829)	0,0001
% Blastocistos	26,41 <sup>b</sup> (3481/13180)	29,49 <sup>a</sup> (1424/4829)	0,0001
Blastocisto/OPU	5,68 <sup>b</sup> (3481/613)	7,74 <sup>a</sup> (1424/184)	0,0005

160 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%.

161

162 As taxas de clivagem e de blastocisto foram maiores ( $p < 0,0001$ ) usando sêmen  
163 sexado em relação ao convencional (Tab. 3).

164

Tabela 3: Taxas de clivagem e blastocisto de acordo com o tipo de sêmen (sexado vs convencional) utilizado na produção *in vitro* comercial de embriões bovinos.

	Sêmen Sexado (n=555)	Sêmen Convencional (n=218)	Valor de p
% Clivagem	81,61 <sup>a</sup> (10362/12697)	61,19 <sup>b</sup> (3272/5347)	0,0001
% Blastocisto	30,08 <sup>a</sup> (3819/12697)	21,13 <sup>b</sup> (1130/5347)	0,0001
Blastocisto/OPU	6,57 <sup>a</sup> (3819/581)	5,18 <sup>b</sup> (1130/218)	0,0059

165 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%.

166

167 Houve influência da estação do ano, pois doadoras aspiradas nas estações  
168 primavera/verão exibiram maior número de oócitos viáveis em relação ao  
169 outono/inverno. No entanto, a sazonalidade não influenciou a taxa de clivagem (0,5066)  
170 e produção embrionária ( $p = 0,403$ ).

171

172

173

174

175

176  
177  
178  
179

Tabela 4: Taxas de oócitos viáveis, clivagem e blastocisto de acordo com época de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) de doadoras utilizadas na produção *in vitro* comercial de embriões bovinos no Brasil.

	Primavera/Verão (n=661)	Outono/Inverno (n=114)	Valor de p
% Oócitos Viáveis	70,56 <sup>a</sup> (15581/22081)	67,28 <sup>b</sup> (2463/3661)	0,0001
% Clivagem	75,70 (11794/15581)	74,70 (1840/2463)	0,2885
% Blastocisto	27,34 (4260/15581)	27,97 (689/2463)	0,5129
Blastocisto/OPU	6,23 (4260/684)	6,00 (689/115)	0,7217

180 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%.

181

182 O grupo genético influenciou as variáveis analisadas ( $p < 0,0001$ ). Ao comparar  
183 doadoras de diferentes grupos genéticos obteve-se superioridade do *Bos indicus*,  
184 representado pela raça Nelore, seguido de fêmeas provenientes de cruzamento industrial  
185 (*Bos indicus* x *Bos taurus*) e por último a sub espécie *Bos taurus* que apresentou os  
186 menores valores.

187

Tabela 5: Taxas de oócitos viáveis, clivagem e produção de blastocisto, de acordo com o grupo genético das doadoras utilizadas na produção *in vitro* comercial de embriões bovinos.

	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>	Valor de p
% Oócitos Viáveis	74,34 <sup>a</sup> (5403/7268)	69,22 <sup>b</sup> (11216/16204)	63,22 <sup>c</sup> (1425/2254)	0,0001
% Clivagem	77,61 <sup>a</sup> (4193/5403)	76,51 <sup>a</sup> (8581/11216)	60,35 <sup>b</sup> (860/1425)	0,0001
% Blastocisto	30,74 <sup>a</sup> (1661/5403)	27,12 <sup>b</sup> (3042/11216)	17,26 <sup>c</sup> (246/1425)	0,0001
Blastocisto/OPU	7,83 <sup>a</sup> (1661/212)	6,15 <sup>b</sup> (3042/495)	2,67 <sup>c</sup> (246/92)	0,0001

188 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%.

189

190

Tabela 6: Taxas de oócitos viáveis, clivagem e blastocisto e blastocisto por sessão de aspiração folicular (OPU) da raça Nelore nas estações Primavera/Verão e Outono/Inverno

Nelore		Valor de p	
	Primavera/ Verão	Outono/Inverno	
% Oócitos Viáveis	73,16 (4506/6159)	72,12 (494/685)	0,8172
% Clivagem	77,83 (4506/3507)	67,83 (494/335)	0,0635

% Blastocisto	30,03 <sup>a</sup> (4506/1353)	19,03 <sup>b</sup> (494/94)	0,0001
BL/OPU	7,08 (191/1353)	4,7 (20/94)	0,1097

191

192

**Tabela 7:** Taxas de oócitos viáveis, clivagem e blastocisto e blastocisto por sessão de aspiração folicular (OPU) da raça Girolando nas estações Primavera/Verão e Outono/Inverno

	Girolando		Valor de p
	Primavera/ Verão	Outono/Inverno	
% Oócitos Viáveis	66,12 (5496/8312)	65,90 (1616/2452)	0,9285
% Clivagem	90,61 <sup>a</sup> (5496/4980)	77,10 <sup>b</sup> (1616/1246)	0,0002
% Blastocisto	33,31 (5496/1831)	31,19 (1616/504)	0,2529
BL/OPU	6,93 (264/1831)	6,07 (83/504)	0,3264

193

194

195

196

197

## DISCUSSÃO

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

No presente estudo foram avaliados dados provenientes de um laboratório comercial no Brasil, durante os anos de 2014 a 2016, período no qual foram realizados 776 procedimentos de OPU, resultando em 25.379 oócitos totais, de cinco raças criadas no país para produção de carne (Nelore, Brangus e Senepol) e leite (Girolando e Holandesa). O objetivo desta análise é retratar os fatores que afetam os resultados finais de produção de blastocisto visando fornecer dados consistentes sobre as limitações encontrados na rotina de um laboratório comercial de porte médio.

Através da análise retrospectiva dos dados foi possível observar que a raça Girolando exibiu o melhor resultado de produção embrionária, seguida pela raça Nelore, enquanto os taurinos (HPB e Senepol) apresentaram os piores resultados. Ao analisar o grupo sanguíneo o *Bos indicus* foi superior seguido pelos animais cruzados (Girolando e Brangus), enquanto nos taurinos (HPB e Senepol) foram confirmados os piores resultados.

Independente da raça ou grupamento sanguíneo de modo geral foi observado que: a maior frequência de aspirações eleva as taxas de clivagem e blastocisto; o uso do sêmen sexado resultou em taxas maiores tanto de clivagem quanto de blastocisto; já a

215 estação do ano primavera/verão embora melhore a qualidade oocitária não influencia a  
216 taxa de clivagem, nem tampouco a taxa de blastocisto quando comparada ao  
217 outono/inverno.

218 A recuperação oocitária não foi influenciada pelas raças trabalhadas pelo  
219 laboratório analisado, e nas doadoras HPB foi maior que os resultados apresentados na  
220 literatura. O desenvolvimento folicular em fêmeas Nelore (Figueiredo et al., 1997) é  
221 semelhante ao observado em fêmeas HPB (Bo et al., 2003), Girolando (Castilho et al.,  
222 2000), Angus, Brahman e Senepol (Alvarez et al., 2010), porém diferenças são  
223 observadas principalmente nos diâmetros foliculares, número de ondas por ciclo, bem  
224 como no número de folículos recrutados por onda. Alvarez et al. (2000) observaram  
225 maior quantidade de pequenos folículos (3 a 5 mm) na emergência de ondas em  
226 Brahman ( $39 \pm 4$ ) em comparação com Senepol ( $33 \pm 4$ ) ou Angus ( $21 \pm 4$ ). Fêmeas da  
227 raça Nelore submetidas às mesmas condições climáticas e nutricionais que as vacas  
228 HPB exibem maior número de folículos recrutados (42,7 vs 19,7) por onda folicular  
229 (Bastos et al., 2010).

230 Essa diferença no número de folículos recrutados influencia diretamente na  
231 aplicação da OPU em termos de recuperação oocitária e conseqüentemente na produção  
232 embrionária devido ao maior recrutamento folicular, em fêmeas da raça Nelore a  
233 recuperação é maior por sessão de OPU, em torno de 30 a 38 oócitos totais, quando  
234 comparada as médias de 6,5 a 16 COC's na raça Holandesa (Pontes et al., 2010; Ratto et  
235 al., 2011; Gimenes et al., 2015). Já em animais da raça Girolando, proveniente do  
236 cruzamento e seus diversos graus de sangue da raça HPB (*Bos taurus*) com o Gir (*Bos*  
237 *indicus*), exibiram melhor recuperação oocitária, variando de acordo com o grau  
238 sanguíneo, de 20,4 a 31,4 oócitos por sessão de OPU (Pontes et al, 2011).

239 As fêmeas da raça HPB exibiram recuperação 24,5 oócitos/sessão de OPU,  
240 resultado superior aos trabalhos consultados, talvez este achado se deva ao número  
241 baixa de doadoras (n=10) avaliadas, provenientes de apenas 1 propriedade, portanto sem  
242 grande variabilidade individual. Além disso, todas as OPUs foram realizadas por apenas  
243 um técnico, o qual apresenta grande domínio da técnica.

244 A taxa de oócitos viáveis, ou seja, a qualidade dos oócitos foi influenciada pela  
245 raça, no entanto, nem sempre foi um predito seguro para a produção embrionária. Nas  
246 doadoras das raças Brangus e Holandesa as altas taxas de oócitos viáveis não  
247 influenciaram a produção de blastocisto, respectivamente 17,5% e 7,48%. A taxa de  
248 oócitos viáveis foi maior no Nelore em comparação ao Girolando, mas as taxas de

249 clivagem e blastocisto foram maiores nas doadoras Girolando (87,54% e 32,83%),  
250 seguido da raça Nelore (77,6% e 30,96%). Enquanto a raça Senepol apresentou a  
251 menor taxa de oócitos viáveis, resultando também em baixa produção de blastocisto.

252 Os oócitos que são selecionados para a PIV são avaliados pelas características  
253 morfológicas em função do número de células do *cumulus* e homogeneidade do  
254 ooplasma (Seneda et al., 2001; Loonergan et al., 1994) Esta classificação está  
255 relacionada com a competência oocitária para o desenvolvimento até o estágio de  
256 blastocisto, e segundo Merton et al. (2003) a qualidade dos oócitos é frequentemente  
257 definida como a competência para produzir um blastocisto dentro de um sistema de  
258 PIV. De modo geral os oócitos de qualidade melhor, geram maiores taxas de  
259 blastocistos (Merton et al., 2003), no entanto, oócitos classe 3 (leves sinais de atresia)  
260 exibiram melhores taxas quando comparados aos de classe 1 e 2 (Blondin e Sirard,  
261 1995). Portanto, a fim de se obter o maior número de embriões nos programas  
262 comerciais, normalmente apenas os oócitos com elevado nível de degeneração são  
263 excluídos da produção (Pontes et al., 2011).

264 Embora as condições de cultivo possam ter impacto sobre o potencial de  
265 desenvolvimento inicial do embrião, a qualidade intrínseca do oócito é o fator chave que  
266 determina a competência oocitária até o estágio de blastocisto (Sirard e Blondin, 1995).  
267 O melhoramento genético para a produção de leite, juntamente com mudanças na  
268 nutrição e manejo, tem sido associado com o declínio na fertilidade de vacas de leite  
269 (Pursley et al., 1997; Snjiders et al., 2000). Em estudos conduzidos pelo grupo do Prof.  
270 Baruselli, foi possível observar que fêmeas *B. taurus* produz menos blastocistos por  
271 OPU-IVEP, quando comparados as doadoras *B. indicus* (Sales et al., 2015; Gimenes et  
272 al., 2015). No entanto, em outro trabalho avaliando dados comerciais, a produção de  
273 embriões (5,5 blastocistos) foi maior na raça Girolando, em comparação com as raças  
274 Gir (*Bos indicus*) e HPB (*Bos taurus*, Pontes et al., 2011).

275 Porém, a competência oocitária não depende somente de fatores intrínsecos, mas  
276 está também relacionada ao tipo de protocolo usado no laboratório, sêmen e método de  
277 obtenção dos oócitos (Merton et al., 2003). No presente estudo, tanto o protocolo *in*  
278 *vitro* e meios, quanto o técnico foram os mesmos e sabe-se que o tipo de meio utilizado  
279 no cultivo de oócitos e embriões exerce importantes influências sobre o  
280 desenvolvimento embrionário na PIV (van Wagendonk-de Leeuw et al., 1998). Uma  
281 parte destas variações pode ser devida as diferentes capacidades de touros para produzir  
282 embriões e alto efeito do macho na eficiência de um programa comercial de PIV (Palma

283 e Sinowatz, 2004). Além do tipo de sêmen (convencional vs sexado) que pode afetar  
284 marcadamente a eficiência de um programa de fertilização *in vitro* (Palma et al., 2008).

285 O tipo de sêmen utilizado influenciou a taxa de clivagem e desenvolvimento  
286 embrionário *in vitro* e para nossa surpresa o sêmen sexado apresentou melhores índices  
287 quando comparado ao convencional. Alguns pesquisadores relataram que não há efeitos  
288 sobre as taxas de desenvolvimento de blastocistos usando sêmen sexado (Carvalho et  
289 al., 2010; Lu e Seidel, 2004), enquanto outros relatam maior clivagem, porém menores  
290 taxas de blastocisto (Blondin et al., 2009). Procedimentos *in vitro* atuais tentam  
291 compensar a diminuição do desenvolvimento embrionário com o uso de sêmen sexado  
292 (Rath et al., 2013), aumentando a concentração de espermatozóides na gota de  
293 fecundação (Barceló-Fimbres et al., 2011). Aumentar a concentração na gota de  
294 fecundação é uma das estratégias utilizadas no laboratório avaliado, no qual a raça que  
295 mais utilizou o sêmen sexado foi o Girolando e foi a que exibiu as melhores taxas de  
296 desenvolvimento embrionário. Porém não é apenas a baixa concentração de  
297 espermatozoides por palheta a responsável pelos baixos e variáveis resultados obtidos  
298 com o sêmen sexado. Alterações morfológicas nos espermatozoides sexados resultantes  
299 do processo de citometria de fluxo podem também ser responsáveis pelo  
300 comprometimento das taxas de desenvolvimento embrionário (Palma et al., 2008).  
301 Portanto, detectar os touros que exibem os melhores resultados na PIV com o sêmen  
302 sexado é outra estratégia adotada pelos laboratórios comerciais visando minimizar a  
303 baixa produção de blastocistos. O sêmen convencional ou sexado, provenientes de 3  
304 touros diferentes, foram testados e de modo geral o convencional produziu mais  
305 blastocistos, porém esta diferença foi inerente ao touro (Nascimento et al., 2015).

306 No presente estudo há uma variabilidade no intervalo entre as sessões de OPU,  
307 pois não é possível manter uma rotina específica pelo fato de ser um laboratório  
308 comercial, o qual trabalha de acordo com a demanda. Porém, na maioria das vezes, as  
309 mesmas vacas eram aspiradas em um intervalo aproximado de 30 dias. Houve aumento  
310 de clivagem e blastocisto quando se analisou estatisticamente doadoras aspiradas de 9 a  
311 17 vezes em comparação as que foram aspiradas de 2 a 8 vezes durante o período  
312 avaliado. Não há explicação fisiológica para este aumento, mas nós acreditamos que  
313 essa maior eficiência esteja relacionada ao fato que as fêmeas que apresentam os  
314 melhores resultados na PIVE são as que os proprietários utilizam mais vezes na OPU,  
315 consequentemente apresentam os melhores resultados.

316 A variação da PIVE de acordo com a raça da doadora já está bem documentada  
317 na literatura, porém o diferencial deste trabalho é que todos os meios e procedimentos  
318 laboratoriais, bem como as OPU's foram realizadas pelos mesmos técnicos, excluindo-  
319 se portanto estas variáveis. Assim, os resultados obtidos são realmente influência de  
320 outros fatores tais como das doadoras de oócitos e conseqüentemente das diferenças  
321 raciais com sua variabilidade imposta pelas condições metabólicas e ambientais do local  
322 de origem destes animais, do tipo de sêmen utilizado, o que reflete a realidade da PIVE  
323 atualmente empregada a campo. Antes de pensar nestas diferenças de resultados como  
324 limitações, elas devem ser utilizadas como indicadores de alternativas para minimizar  
325 esta variabilidade nos resultados ou para informar aos clientes interessados em utilizar  
326 estas biotécnicas em suas propriedades. A OPU-PIVE é uma técnica extremamente  
327 versátil que quando bem conduzida resulta em ganhos genéticos extraordinários para o  
328 produtor de carne ou leite.

### 329 CONCLUSÃO

330

331 Diante do exposto concluímos que a produção *in vitro* de embriões bovinos é  
332 influenciada pelos fatores analisados e para nossa surpresa o sêmen sexado apresentou  
333 maior taxa de blastocisto comparada ao convencional;

334 A raça e o grupamento sanguíneo exercem influência nos resultados, sendo nas  
335 doadoras da raça Girolando e no grupamento *Bos indicus* as melhores taxas de  
336 blastocistos.

337

338

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

339

340 ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, C.C. et al. Ovarian and endocrine  
341 characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a  
342 subtropical environment. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1291–1302, 2000.

343

344 BARCELÓ-FIMBRES, M.; CAMPOS-CHILLÓN, L.F.;SEIDEL JR, G.E. *In vitro*  
345 fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter  
346 pressure, and bull effects. *Reprod. Domest. Anim.*, v.46, p.495-502, 2011.

347

- 348 BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P. et al. Ovarian function  
349 and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. Acta Sci. Vet.  
350 (Abstract in press). 2010  
351
- 352 BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. & MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of  
353 follicular development in *Bos indicus* cattle. Anim. Reprod. Sci., v.78, p.307-326, 2003.  
354
- 355 BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V. et al. Analysis of bovine sexed sperm  
356 for IVF from sorting to the embryo. Theriogenology., v.71, n.1, p.30-38, 2009.  
357
- 358 BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. Anim. Reprod., v.12, n.3,  
359 p.356-8, 2015.  
360
- 361 BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining  
362 characteristics for development competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., v.  
363 41, p. 54-62, 1995.
- 364 BOLS, P.E; JORSSSEN, E.P; GOOVAERTS, I.G. et al. High throughput non-invasive  
365 oocyte quality assessment: the search continues. Anim. Reprod., v.3, p.420-25, 2012.  
366
- 367 BUENO, A.P; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. Rev. Cient.  
368 Eletron. Med. Vet. 2008. Disponível em:  
369 <[http://www.faeef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/pyqdj1dprseHFg](http://www.faeef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/pyqdj1dprseHFg)  
370 W\_2013-6-13-15-24-57.pdf> Acessado em: 15 set. 2017.  
371
- 372 CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M. et al. Quality assessment of  
373 bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use *in vitro*  
374 embryo production. Theriogenology, v.74, p.1521-1530, 2010.  
375
- 376 CASTILHO, C.; ASSIS, G.S.; GARCIA, J.M. Influência do diâmetro e da fase folicular  
377 sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. Arq. Bras.  
378 Med. Vet. Zootec., v.59, n.2, p.288-294, 2007.  
379
- 380 CASTILHO, C.; GAMBINI, A.L.G.; FERNANDES, P. et al. Synchronization of  
381 ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist,

- 382 prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. Braz. J.  
383 Med. Biol. Res., v. 33, p.91-110, 2000.
- 384
- 385 FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular  
386 dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*), Theriogenology, v.47, p.1489-1505, 1997.
- 387
- 388 GIMENES, L.U.; FERRAZ, M.L.; FANTINATO-NETO, P. et al. The interval between  
389 the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum  
390 pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos*  
391 *taurus* and *Bubalus bubalis*. Theriogenology, v.83, p.385-393, 2015.
- 392
- 393 GONELLA-DIAZA, A.M.; HOLGUÍN, D.; MONTAÑA, D. et al. Corpus luteum  
394 diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data  
395 analysis from 17,521 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo  
396 production program. Anim. Reprod., v.10, n.2, p.106-111, 2013.
- 397
- 398 LONERGAN, P; FAIR, T., *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts.  
399 Theriogenology, v.69, p.17-22, 2008
- 400
- 401 LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. et al. Effect of follicle size on bovine  
402 oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and  
403 culture *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., v.37, p.48-53, 1994.
- 404
- 405 LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparina and sperm concentration on cleavage  
406 and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow  
407 cytometrically-sorted sperm. Theriogenology, v.62, p.819-830, 2004.
- 408
- 409 MERTON, J.S.; DE ROSS, A.P.W.; MULLAART, E. Factors affecting oocyte quality  
410 and quantity in comercial application of embryo Technologies in the cattle breeding  
411 industry. Theriogenology, v.59, p.651-674, 2003.
- 412
- 413 NASCIMENTO, P.S.; CHAVES, M.S.; FILHO, A.S.; et al. Produção *in vitro* de  
414 embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 girolando. Cienc. Anim. Bras., v.16,  
415 n.3, p.358-368, 2015.

416

417 PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMULLER, C.H. Effects of Sex-sorted  
418 Spermatozoa on the Efficiency of *in vitro* Fertilization and Ultrastructure of *in vitro*  
419 Produced Bovine Blastocysts. *Anat. Histol. Embryol*, v. 37, p.67-73, 2008.

420

421 PALMA, G. A. and SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production  
422 of bovine embryos. *Anat. Histol. Embryol*, v.33, p.257–262, 2004.

423

424 PERRY, G. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals,  
425 International Embryo Transfer Society (IETS) – Newsletter, Data Retrieval Committee.  
426 2016. Disponível em:

427 <[http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_2015\\_V2](http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2)>. Acessado em:  
428 8 dez.2017.

429

430 PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C, et al. Ovum pick up, *in vitro*  
431 embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using  
432 Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v.75, p.1640-1646, 2011.

433 PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C. et al. Large-scale *in vitro* embryo  
434 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus* and indicus-taurus dairy  
435 cows using sexed sperm. *Theriogenology*, n.74, p.1349-1355, 2010.

436

437 PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C.; STEVENSON, J.S. et al. Pregnancy rates per  
438 artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronised ovulation or  
439 synchronized oestrous. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.295-300, 1997.

440

441 RATH, D.; BARCIKOWSKI, S.; DE GRAAF, S. et al. Sex selection of sperm in farm  
442 animals: status report and developmental prospects. *Reproduction*, v.145, p.15-30,  
443 2013.

444

445 RATTO, M.H.; PERALTA, O.A.; MOGOLLON, G. Transvaginal ultrasound-guided  
446 cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef  
447 and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. *Anim. Reprod. Sci.*,  
448 v.129, p.1-6, 2011.

449

- 450 RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Effect of  
451 duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in  
452 cattle. *Reprod. fert. Develop.*, v. 20, n. 6, p. 734-740, 2008.
- 453
- 454 SALES, J.N.S.; IGUMA, L.T.; BATISTA, R.I.T.P. et al. Effects of a high-energy diet  
455 on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J.*  
456 *Dairy Sci.*, v.98, p. 3086–3099, 2015.
- 457
- 458 SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. et al. Relationship between follicle size  
459 and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.37-43, 2001.
- 460
- 461 SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod.*  
462 *Sci.* v.42, p.417-426, 1995.
- 463
- 464 SNJIDERS, S.E.; DILLON, P.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of  
465 genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte  
466 development in dairy cows. *Theriogenology*, v.53, p.981-989, 2000.
- 467
- 468 TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J. N. et al. *In vitro* and *in vivo* quality of  
469 bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v.78, n. 1, p.  
470 1465-1475, 2012.
- 471
- 472 VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; AERTS, B.J.G.; DEN DAAS, J.H.G.  
473 Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a  
474 field study. *Theriogenology.*, v.49, p.883-894, 1998.
- 475
- 476 VARAGO, F.C; MENDONÇA, L.F; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões  
477 bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras.*  
478 *Reprod. Anim.*, v.32, p.100-109, 2008.
- 479
- 480 VIANA, J.H.M. Produção de embriões bovinos *in vivo* (transferência de embriões - TE)  
481 e *in vitro* (Fecundação *in vitro* FIV) no Brasil: histórico, cenário atual e perspectivas. In:  
482 SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 1., 2008, Pelotas, RS. *Anais...* Pelotas:  
483 EMBRAPA, 2008. p.48-55.

O manuscrito (Artigo Científico II) está formatado conforme as normas do periódico *Animal Reproduction Science*, exceto pelas tabelas que estão inseridas ao longo do texto, com o intuito de facilitar a compreensão.

484 **Avaliação retrospectiva dos fatores que influenciam a taxa de prenhez em**  
485 **programa comercial de produção *in vitro* de embriões**

486

487 Bárbara Gomes Rodrigues Nogueira<sup>a</sup>, Lilian Franscico Arantes de Souza<sup>b</sup>, Kleber  
488 Luciano Ancioto<sup>c</sup>, Raquel Zaneti Puelker<sup>d</sup>, Caliê Castilho<sup>a\*</sup>

489

490 <sup>a</sup> Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente (UNOESTE), SP, Brasil

491 <sup>b</sup> Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente (UNOESTE), SP, Brasil

492 <sup>c</sup> Gene up, Biotecnologia em Reprodução Animal, Regente Feijó, SP, Brasil

493 <sup>d</sup> Empresa PROGEST – Biotecnologia de Reprodução Animal, Sorocaba, SP, Brasil

494

495 \* Corresponding author. Tel.: +55 18 32292077; Fax: +55 18 3229-2080.

496 E-mail addresses: [calie@unoeste.br](mailto:calie@unoeste.br) Postal address: Rodovia Raposo Tavares, Km

497 572 - Bairro Limoeiro Presidente Prudente, SP- Brasil- CEP:19067-175

498

499 RESUMO

500 Objetivou-se com o presente estudo verificar os fatores que influenciam na taxa de  
501 prenhez de embriões produzidos *in vitro* em escala comercial. Foram utilizados dados  
502 retrospectivos de 20.297 transferências de embriões produzidos *in vitro*, provenientes de  
503 1.400 doadoras de oócitos de raças destinadas à produção de carne (Nelore, Angus,  
504 Brangus, Bonsmara, Brahman, Canchim, Senepol e Tabapuã) e leite (Gir, Girolando,  
505 Holandesa e Jersey) criadas no Brasil. As doadoras de procedências distintas, eram  
506 mantidas sob diferentes condições de manejo. A produção de embriões *in vitro* seguiu  
507 os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório, sendo todos os trabalhos feitos por  
508 apenas um técnico de laboratório e dois profissionais de campo. A análise estatística dos

509 dados foi realizada utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for  
510 Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC) empregando-se o Teste Qui-quadrado com um  
511 nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A taxa de prenhez foi maior na estação  
512 primavera/verão quando compara ao outono/inverno; o uso de sêmen convencional na  
513 FIV resulta em mais prenhez ( $p < 0,0001$ ). Embriões nos estádios acima de blastocisto  
514 resultam em maiores taxas que as obtidas com mórula e Bi. O genótipo da doadora e  
515 receptora afeta os resultados, influenciada pela sazonalidade, pois fêmeas de raças  
516 leiteiras exibem maiores taxas de prenhez no outono/inverno, enquanto as de corte são  
517 melhores na primavera/verão. Diante do exposto concluímos que a taxa de prenhez de  
518 embriões bovinos produzidos *in vitro* é influenciada pela raça e sazonalidade, além do  
519 tipo de sêmen e estágio do embrião inovulado.

520 Palavras – chave: Blastocisto; *Bos indicus*; *Bos taurus*; Clivagem; Prenhez;  
521 Sazonalidade.

522

523 ABSTRACT

524 Aimed of this study was to verify the factors influencing the pregnancy rate of embryos  
525 *in vitro* produced on a commercial scale. Retrospective data were collected from 20,297  
526 embryo transfers *in vitro* produced from 1,400 donors of oocytes from beef breeds  
527 (Nelore, Angus, Brangus, Bonsmara, Brahman, Canchim, Senepol and Tabapuã) and  
528 dairy cattle (Gir, Girolando, Holstein and Jersey) in Brazil. Donors from different  
529 backgrounds were kept under different management conditions. *In vitro* embryo  
530 production followed the protocols already established by the Laboratory, all the work  
531 being done by only one laboratory technician and two field professionals. Statistical  
532 analysis of the data was performed using the Statistical Analysis System for Windows  
533 (SAS Inst., Inc., Cary, NC) software using the Chi-square test with a significance level

534 of 5% ( $p < 0.05$ ). The pregnancy rate was higher in the spring/summer season when  
535 compared to autumn/winter; the use of no sexed semen in IVF results in more  
536 pregnancy. Embryos in the above blastocyst stages result in higher rates than those  
537 obtained with morula. The donor and recipient genotype affects the results, influenced  
538 by seasonality, since dairy cows exhibit higher pregnancy rates in the autumn/winter,  
539 while those in the beef breed are better in spring/summer. Considering the above, we  
540 conclude that the pregnancy rate of bovine embryos produced *in vitro* is influenced by  
541 breed and seasonal variation, as well as the type of semen and stage of the embryo.

542 Key words: Blastocyst; *Bos indicus*; *Bos taurus*; Cleavage; Pregnancy; Seasonality.

543

#### 544 **1. Introdução**

545 Detentor de tecnologias avançadas, o agronegócio brasileiro representa 23% do  
546 total do produto interno bruto (PIB) nacional. O aprimoramento das técnicas  
547 reprodutivas relacionadas à pecuária é crescente e intensa quando temos o Brasil no  
548 patamar de segundo maior rebanho efetivo de bovinos, chegando a mais de 218 milhões  
549 de animais (IBGE, 2017), maior exportador de carne e quarto maior produtor de leite  
550 mundial.

551 A criopreservação de espermatozoides e a inseminação artificial (IA),  
552 associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram  
553 fases importantes e decisivas para o melhoramento genético dos animais de produção  
554 (Isag, 2006). Dentre as biotécnicas reprodutivas, a PIVE tem sido considerada uma  
555 alternativa importante para a rápida multiplicação de linhagem feminina em bovinos de  
556 corte e leite.

557 Quando a produção de embriões *in vitro* (PIVE) é associada à técnica de  
558 aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* - OPU) é possível produzir

559 embriões na espécie bovina sem levar em consideração o estágio do ciclo estral,  
560 podendo-se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos  
561 recuperados (Varago et al., 2008), bem como utilizar doadoras que apresentam  
562 infertilidade ou distúrbios patológicos adquirido do aparelho reprodutor feminino  
563 (Bueno e Beltran, 2008), além de fêmeas pré-púberes e até mesmo gestantes (Goodhand  
564 et al., 1999; Taneja et al., 2000).

565 O uso de sêmen convencional resulta na produção de maior proporção de  
566 embriões macho, porém com a difusão do uso de sêmen sexado um novo mercado se  
567 abriu para a OPU-PIVE que foi o advento do rebanho de origem leiteira para os  
568 programas de melhoramento genético (Viana et al., 2012).

569 Apesar dos avanços em larga escala, a técnica ainda apresenta variabilidade  
570 nos resultados obtidos pelos laboratórios em termos de produção embrionária, tanto  
571 quanto a campo, na taxa de prenhez pós-inovulação. Diferentes estudos reportaram  
572 haver variação de produção de embriões *in vitro* entre 10 e 40% (Lonergan e Fair, 2008)  
573 e taxa de prenhez entre 30 e 40% (Peterson e Lee, 2003).

574 Sabe-se que a viabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* é inferior  
575 aos obtidos através da técnica de transferência de embriões (TE) *in vivo* (Greve, 1992;  
576 Greve et al., 1993), provavelmente devido a alterações morfológicas e funcionais  
577 provocadas nessas condições (Avery e Greve, 1995), podendo resultar em um aumento  
578 de mortalidade fetal pós TE e significativas perdas econômicas (Binelli et al., 2001).

579 A taxa de sobrevivência embrionária após a inovulação pode ser influenciada  
580 por fatores como anormalidades cromossômicas, efeito da doadora, idade e qualidade  
581 dos embriões inovulados, método e local da transferência, sincronia doadora/receptora,  
582 estado nutricional e concentração sérica de progesterona na receptora, bem como  
583 estresse calórico (Hansen e Ealy, 1991).

584 Muitos fatores influenciam a taxa de prenhez, gerando alta variabilidade nos  
585 resultados aplicados desta biotécnicas. Na maioria dos trabalhos comerciais no Brasil a  
586 remuneração deste serviço prestado é o pagamento da prenhez positiva, portanto este é o  
587 principal gargalo da OPU-PIV, pois a adesão do proprietário também está intimamente  
588 ligada ao sucesso pós inovulação.

589 Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho analisar dados de um  
590 laboratório comercial de PIV para verificar se as variáveis: sazonalidade, tipo de sêmen,  
591 estágio embrionário e raça (doadora e receptora) influenciam na taxa de prenhez de  
592 embriões produzidos em larga escala.

593

## 594 **2. Material e Métodos**

595 O presente estudo foi conduzido utilizando dados retrospectivos do período de  
596 novembro de 2009 a abril de 2016, fornecidos por um Laboratório Comercial de  
597 produção *in vitro* de embriões, localizado no município de Regente Feijó, oeste do  
598 Estado de São Paulo (Latitude 22° 13' S e Longitude 51° 18').

599 Os embriões produzidos na cidade de Regente Feijó, foram transferidos para  
600 receptoras localizadas em 115 propriedades distintas distribuídas pelos estados de  
601 Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná, com distância máxima de 600 km do  
602 laboratório. Sendo, no entanto, mais de 80% das propriedades atendidas, localizadas em  
603 no máximo 200 Km de distância.

### 604 **2.1. Animais**

605 Foram utilizados dados de 20.297 transferências de embriões produzidos *in*  
606 *vitro*, provenientes de 1.400 doadoras de oócitos das seguintes raças: Nelore (682),  
607 Girolando (282), Brangus (246), Senepol (58), Holandesa (49), Gir (47), Bonsmara  
608 (24), Angus (5), Tabapuã (3), Brahman (2), Canchim (1) e Jersey (1).

609 As doadoras são de procedências distintas, portanto os animais eram mantidos  
610 sob diferentes condições de manejo, de acordo com a rotina estabelecida em cada  
611 propriedade.

612 As fertilização *in vitro* eram realizadas com diferentes raças de touro, de acordo  
613 com o acasalamento de cada propriedade.

614 As receptoras dos embriões produzidos *in vitro* eram das raças: Nelore,  
615 Girolando, Brangus, Simental, Bonsmara, Holandesa, Angus e Pardo Suiço.

## 616 2.2. Transporte de embriões e protocolo para transferência de embriões

617 As fêmeas utilizadas como receptoras dos embriões produzidos *in vitro* eram de  
618 Nelore, Brangus, Girolando, Simental, Bonsmara, Holandesa e Angus de 115 diferentes  
619 fazendas. Um protocolo de transferência de embrião em tempo fixo foi usado para  
620 sincronia do estro do receptora, de acordo com Pontes et al. (2010). Cada receptora  
621 recebeu um implante de progesterona intravaginal e 2 mg de benzoato de estradiol no  
622 dia 0. Os implantes de progesterona foram removidos no dia 8, quando os animais  
623 receberam uma injeção de 300 UI de eCG, 150 µg de d-cloprostenol e 1 mg de  
624 cipionato de estradiol. O dia 10 foi considerado o dia do estro e os embriões foram  
625 transferidos no dia 17. Antes da transferência do embrião, os ovários de cada receptora  
626 eram examinados por ultrassom (Aloka SSD 500® com transdutor linear de 5 MHz,  
627 Tóquio, Japão) ou palpação retal para confirmar a presença e o tamanho do CL com  
628 posterior inovulação do embrião no ápice do corno ipsilateral ao CL. Os embriões  
629 foram classificados de acordo com os critérios do IETS (Wright, 1998) e apenas  
630 embriões de graus I ou II foram considerados aptos para transferência. Embriões nos  
631 estádios de mórula (quando receptoras em excesso) a blastocisto expandido no dia 7  
632 após a fecundação, foram envazados e transferidos individualmente para cada receptora.  
633 Todos os embriões foram transferidos à fresco, com um tempo máximo de 12 h de

634 transporte até a inovulação. Os embriões foram colocados em palhetas de 0,25 mL e  
635 transportados em um transportador WTA® (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda.,  
636 Cravinhos, SP, Brasil) a 37 ° C.

### 637 2.3. Avaliação da prenhez

638 Em torno de 30 dias após a inovulação foi feito o diagnóstico de gestação  
639 utilizando equipamento de ultrassom (Aloka SSD 500® with 5 MHz linear transducer,  
640 Tokyo, Japan).

### 641 2.4. Análise Estatística

642 Foram analisadas a influência de cinco variáveis: sazonalidade (primavera/verão  
643 vs outono/inverno), tipo de sêmen (sexado vs convencional), estágio embrionário e raça  
644 (da doadora e receptora) sobre a taxa de prenhez.

645 Para avaliar o efeito do tipo de sêmen, sazonalidade e estágio do embrião  
646 inovulado foram analisadas 20297 inovulações de doze raças, as quais estão citadas  
647 anteriormente. Porém, para análise do efeito da raça da doadora (Nelore, Girolando,  
648 Brangus, Senepol, Holandesa, Gir, Bonsmara) e raça da receptora (Nelore, Girolando,  
649 Brangus, Simental, Bonsmara, Holandesa, Angus e Pardo Suiço) foram utilizadas  
650 apenas as raças com mais de cem procedimentos realizados.

651 O efeito da sazonalidade foi avaliado, independente da raça, dividindo os  
652 procedimentos de inovulações em dois grupos. Grupo Primavera/Verão: inovulações  
653 realizadas entre o dia 22 de setembro e 20 de março e grupo Outono/Inverno:  
654 inovulações realizadas entre 21 de março e 21 de setembro.

655 Foram transferidos embriões que estavam em diferentes estágios de  
656 desenvolvimento: mórula (Mo, n=41), blastocisto inicial (Bi, n=109), blastocisto (Bl,  
657 n=203), blastocisto expandido (Bx, n=257) e blastocisto eclodido (Be, n=13) e  
658 analisado as respectivas taxas de prenhez.

659 A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa  
 660 computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC)  
 661 empregando-se o Teste Qui-quadrado, utilizando nível de significância de 5%.

662

### 663 3. Resultados

664 A sazonalidade influenciou a taxa de prenhez e foi maior na primavera/verão  
 665 quando comparada ao outono/inverno (Tabela 1).

666

**Tabela 1:** Taxa de prenhez de acordo com a estação do ano em que os embriões bovinos produzidos *in vitro* em larga escala foram inovulados, independente da raça.

	<b>Primavera/Verão</b>	<b>Outono/Inverno</b>
<b>% prenhez</b>	42,75 <sup>a</sup>	37,70 <sup>b</sup>
	(5769/13493)	(2565/6804)

Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado ( $p < 0,0001$ ).

667

668 Quando agrupamos a variação sazonal de acordo com a raça, foi possível  
 669 observar que as doadoras de oócitos das raças Nelore e Brangus apresentaram maior  
 670 taxa de prenhez na estação primavera/verão ao comparar com outono/inverno. Por outro  
 671 lado, as doadoras de raças leiteiras (europeu e Zebu) apresentam melhores taxas no  
 672 outono/inverno, enquanto as doadoras Girolando e Senepol não sofreram influência do  
 673 período do ano.

674

675

676

677

678

679

**Tabela 2:** Taxa de prenhez nas estações do ano de acordo com a raça da doadora de embriões produzidos *in vitro*.

<b>Raça</b>	<b>% prenhez Primavera/Verão</b>	<b>% prenhez Outono/Inverno</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Nelore</b>	43,95 <sup>a</sup>	37,29 <sup>b</sup>	p<0.0001
<b>Girol</b>	38,35	37,65	p=0.6183
<b>Brangus</b>	45,98 <sup>a</sup>	37,19 <sup>b</sup>	p=0.0030
<b>Senepol</b>	26,69	25,53	p=0.8987
<b>Holandesa</b>	21,66 <sup>b</sup>	42,86 <sup>a</sup>	p=0.0013
<b>Gir</b>	33,96 <sup>b</sup>	50,81 <sup>a</sup>	p=0.0012

680 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%.

681

682 Ao comparar o efeito da sazonalidade de transferência dos embriões PIV, as  
 683 receptoras de corte (europeu ou zebu) apresentaram melhores taxas de prenhez durante a  
 684 primavera/verão, enquanto que a raça Holandesa se expressa melhor no outono/inverno.  
 685 Enquanto a taxa de prenhez não variou em função da estação do ano nas raças  
 686 Girolando e Brangus.

687

688

689

690

691

692

693

**Tabela 3:** Taxa de prenhez nas estações do ano de acordo com a raça da receptora de embriões produzidos *in vitro*.

Raça	% prenhez		Valor de p
	Primavera/verão	Outono/inverno	
Nelore	45,07 <sup>a</sup>	39,27 <sup>b</sup>	p<0.0001
Girol	39,16	36,10	p=0.0708
Brangus	42,10	42,63	p=0.8502
Europeu de corte*	48,05 <sup>a</sup>	37,09 <sup>b</sup>	p<0.0001
Holandês	18,66 <sup>b</sup>	39,09 <sup>a</sup>	p=0.0039

694 Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado a 5%. \*Raças Simental, Bonsmara e Angus.

695 A taxa de prenhez foi maior, independente da raça, quando o sêmen convencional foi  
696 utilizado (Tabela 4).

697

**Tabela 4:** Taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro* em larga escala de acordo com o tipo de sêmen utilizado na fecundação.

	Sêmen convencional	Sêmen sexado
% prenhez	43,17 <sup>a</sup>	38,40 <sup>b</sup>
	(4890/11328)	(3444/8969)

Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado (p<0,0001).

698

699 O estágio de desenvolvimento embrionário influenciou a taxa de prenhez, sendo  
700 maior em embriões com o desenvolvimento mais avançado (Tabela 5).

701

702

703

704

705

**Tabela 5:** Taxa de prenhez de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* inovulados.

	<b>Blastocisto</b>				
	<b>Mórula (Mo)</b>	<b>Inicial (Bi)</b>	<b>Blastocisto (Bl)</b>	<b>Expandido (Bx)</b>	<b>Eclodido (Be)</b>
<b>% prenhez</b>	24,39 <sup>b</sup>	31,19 <sup>b</sup>	44,33 <sup>a</sup>	48,25 <sup>a</sup>	46,15 <sup>a</sup>
	(10/41)	(34/109)	(90/203)	(124/257)	(6/13)

Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado (p=0,0046)

706

707 As doadoras das raças Brangus, Bonsmara e Gir apresentaram a maior taxa de  
708 prenhez, seguida pela raça Nelore, por outro lado as menores taxas foram apresentadas  
709 pelas doadoras das raças Holandesa e Senepol (Tabela 6).

710 Houve efeito da raça da receptora na taxa de prenhez, a qual foi maior nas raças  
711 Bonsmara, Angus e Nelore, sendo as demais raças demonstradas na tabela 7.

712

**Tabela 6:** Taxa de prenhez de acordo com a raça da doadora de oócitos para a produção de embriões *in vitro* em larga escala.

	<b>Nelore</b> <b>(n=682)</b>	<b>Girolando</b> <b>(n=282)</b>	<b>Brangus</b> <b>(n=246)</b>	<b>Senepol</b> <b>(n=60)</b>	<b>Bonsmara</b> <b>(n=24)</b>	<b>Gir</b> <b>(n=47)</b>	<b>Holandês</b> <b>(=49)</b>
<b>% Prenhez</b>	41,74 <sup>b</sup> (4196/10052)	38 <sup>c</sup> (1981/5213)	45,25 <sup>a</sup> (1724/3810)	26,26 <sup>d</sup> (99/377)	50,38 <sup>a</sup> (66/131)	44,23 <sup>ab</sup> (180/407)	28,63 <sup>d</sup> (67/234)

Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado (p&lt;0,0001).

713

714

**Tabela 7:** Taxa de prenhez de acordo com a raça da receptora de embriões produzidos *in vitro* em larga escala.

	<b>Nelore</b>	<b>Brangus</b>	<b>Holandesa</b>	<b>Simental</b>	<b>Girolando</b>	<b>Pardo Suíço</b>	<b>Bonsmara</b>	<b>Aberdeen e Red Angus</b>
<b>% Prenhez</b>	43,40 <sup>ab</sup> (3178/7322)	42,25 <sup>b</sup> (978/2315)	31,73 <sup>c</sup> (66/208)	38,39 <sup>bc</sup> (281/732)	37,65 <sup>bc</sup> (1282/3405)	37,40 <sup>bc</sup> (49/131)	47,55 <sup>a</sup> (252/530)	45,00 <sup>ab</sup> (63/140)

715

Letras diferentes na linha diferem pelo teste do qui-quadrado (p&lt;0,0001).

716 **Discussão**

717 Foram analisados e compilados dados provenientes de 20.297 inovulações de  
718 embriões de raças expressivas para produção de carne (Nelore, Angus, Brangus, Bonsmara,  
719 Brahman, Canchim, Senepol e Tabapuã) e leite (Gir, Girolando, Holandesa e Jersey) criados  
720 no Brasil, visando identificar os principais fatores que afetam o resultado final da aplicação  
721 destas biotécnicas, ou seja, a taxa de prenhez.

722 A produção de embriões *in vitro* no período avaliado, de novembro de 2009 a abril de  
723 2016, foi realizada por apenas um técnico responsável pela produção dos meios e protocolo  
724 laboratorial, enquanto as inovulações foram realizadas, em sua grande maioria, por apenas  
725 dois profissionais, igualmente capacitados, que seguem os mesmos protocolos a campo, fato  
726 incomum ao comparar dados de um período longo, corroborando para a qualidade dos  
727 resultados aqui apresentados.

728 De modo geral, os resultados obtidos indicam que a taxa de prenhez é influenciada  
729 pela época do ano, pelo tipo de sêmen utilizado e pelo estágio do embrião inovulado. Além  
730 disso, ficou evidenciado o efeito da raça, tanto da doadora de oócito quanto da receptora, nas  
731 taxas de prenhez.

732 A influência da estação do ano sobre a competência oocitária para o desenvolvimento  
733 *in vitro* tem sido avaliada por diferentes estudos, no entanto trabalhos abordando a taxa de  
734 prenhez após a inovulação destes embriões, em programas comerciais, ainda são poucos e  
735 com diferentes enfoques. Em trabalho pioneiro de análise retrospectiva de dados comerciais  
736 de doadoras de 8 raças, predominando a raça Nelore, a taxa de prenhez encontrada no verão  
737 foi 36,2% e foi superior às obtidas no inverno 29,2% (Dayan, 2000). Em estudo retrospectivo  
738 com receptoras cruzadas (*B. taurus* × *B. indicus*), menores taxas de prenhez foram observadas  
739 durante o outono/inverno em comparação com a primavera/verão, respectivamente 41,1%  
740 (448/1090) vs. 48,1% (1760/3658) (Nasser, et al., 2010). Estas diferenças podem ser

741 decorrentes da sazonalidade na oferta de alimentos, pois na primavera/verão são mais  
742 disponíveis e de melhor qualidade, proporcionando melhores condições corporais que  
743 refletem diretamente na reprodução, aumentando a qualidade dos oócitos, bem como a taxa de  
744 concepção. Por outro lado, em revisão, Alexander (2010) descreve que ambientes quentes  
745 aumentam as temperaturas sanguínea, retal e uterina e também suprimem a fertilidade, a  
746 puberdade, a espermatogênese, a ciclicidade ovariana, a ovulação, a oogênese e a  
747 embriogênese. Estas respostas distintas, são atribuídas as diferentes linhagens trabalhadas  
748 (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) e foram confirmadas no presente estudo ao analisar a  
749 sazonalidade de acordo com a raça da doadora de oócitos e das receptoras de embrião.

750 Com relação à raça da doadora, melhores resultados foram observados nas raças  
751 Nelore e Brangus na primavera/verão, enquanto doadoras das raças Holandesa e Gir tiveram  
752 melhores taxas de prenhez no outono/inverno. Ao comparar a época do ano com a raça da  
753 receptora o resultado encontrado nas raças Nelore e Holandesa se manteve, ou seja, Nelore  
754 apresenta melhor desempenho na primavera/verão, enquanto as Holandesas no  
755 outono/inverno.

756 É sabido que animais *Bos indicus* (zebu) têm maior eficiência termorregulatória  
757 quando comparados aos *Bos taurus* (europeu) devido à menor produção interna de calor e  
758 dissipação de calor no ambiente, sendo as raças *Bos indicus* mais resistentes à hipertermia  
759 (Torres-Junior et al., 2008). As vacas em lactação *Bos taurus* são mais suscetíveis ao estresse  
760 térmico, pois a alta produção de calor metabólico associada à lactação predispõe à hipertermia  
761 (Yaser et al., 1999) e, por essa razão, a fertilidade nas novilhas é maior (Badinga et al. 1985).  
762 A lactação parece também afetar os índices em *Bos indicus* leiteiro, pois observamos menor  
763 desempenho de doadoras da raça Gir nas épocas mais quentes do ano. Vacas leiteiras  
764 apresentam taxas de concepção altamente prejudicadas pelas elevadas temperaturas  
765 ambientais, apresentando redução que podem atingir valores de 20 a 30% na taxa de prenhez

766 durante o verão quando comparado ao inverno (Cavestany et al., 1985, Badinga et al., 1985,  
767 De Rensis et al., 2002, Pires et al., 2002). O presente estudo confirma esse efeito deletério,  
768 pois houve redução de 20% na taxa de prenhez na raça Holandesa na primavera/verão.

769 A incorporação da tecnologia do sêmen sexado na PIV tornou esta biotécnica acessível  
770 ao rebanho leiteiro, favorecendo a multiplicação e oferta de genética superior de fêmeas,  
771 enquanto no gado de corte é possível produzir machos em larga escala para o abate. Neste  
772 contexto, o sexo da prole desempenha papel fundamental no desempenho produtivo de  
773 bovinos de corte e leite, porque muitas características produtivas dependem diretamente do  
774 gênero (Morotti et al., 2014). Em vacas de alta produção leiteira, a taxa de concepção pós  
775 inovulação é maior que a obtida usando IA, sobretudo no verão (Rodrigues et al., 2007). A  
776 taxa de prenhez no presente estudo com sêmen sexado, independente da raça ou estação do  
777 ano, foi apenas 4,6% menor que o convencional, corroborando com outros estudos em larga  
778 escala, nos quais a eficiência do sêmen sexado, para produção de fêmeas leiteiras (Pontes et  
779 al., 2010) ou machos para o abate (Pellegrino et al., 2016), foi comprovada.

780 Maior taxa de concepção foi obtida quando embriões foram transferidos nos estádios  
781 de blastocisto, blastocisto expandido e eclodido, 44, 46 e 48%, enquanto a taxa para mórulas  
782 transferidas foi de apenas 24% de prenhez. Gonella-díaz et al. (2013) também observaram  
783 maior taxa para Bx (37%) quando comparada com a inovulação de mórulas, apenas 15,4%. À  
784 medida que o embrião “envelhece” ele adquire tolerância térmica, dessa forma os embriões  
785 em estádios mais avançados promoveriam maiores índices de prenhez (Ealy et al., 1993). Em  
786 revisão recente, Sakatani (2017) confirma que a sensibilidade dos embriões ao calor é estágio  
787 dependente, sendo no começo do desenvolvimento embrionário, 1 a 8 células, mais  
788 suscetíveis a temperaturas elevadas do que estádios mais avançados como mórula ou  
789 blastocisto. Por este motivo, a transferência de embriões (TE), é a tecnologia principal para  
790 elevar a taxa de concepção de vacas de alta produção leiteira no verão, pois nos estádios mais

791 sensíveis ao estresse térmico o embrião está na incubadora em temperatura controlada de 38,5  
792 a 39°C. Diversos autores recomendam a transferência de embriões em estágio após mórula  
793 compacta e antes de blastocisto eclodindo (Schneider *et al.*, 1980; Hasler, 2001).

794       Está bem descrito que o elemento chave para o sucesso e difusão rápida da PIV no  
795 Brasil é o rebanho composto em mais de 80% por animais da raça Nelore (Thibier, 2005). No  
796 entanto, no presente estudo, ainda que tenha havido forte influência da raça, tanto da doadora  
797 como da receptora na taxa de sucesso pós inovulação, para nossa surpresa a raça Nelore não  
798 foi a que exibiu os melhores resultados. As doadoras das raças Bonsmara (50,3%) e Brangus  
799 (45,2%) exibiram as maiores taxas de prenhez, ao passo que as piores taxas foram observadas  
800 nas Holandesas (28,6%) e Senepol (26,2%). Enquanto as receptoras Bonsmara (47%), Angus  
801 (45%) e Nelore (43%) demonstraram as melhores taxas de prenhez, nas receptoras  
802 Holandesas a taxa mais baixa (37%) se manteve. Nossos resultados estão de acordo com as  
803 taxa de prenhez em doadoras Holandesas (36%), Girolando (37%) com diferentes graus de  
804 sangue e Gir (40%) obtidas de dados comerciais por Pontes *et al.* (2010).

805       As diferenças entre as raças de corte e leite podem ser explicadas, em parte, pela alta  
806 produção de calor metabólico associada à lactação, predispondo à hipertermia (Yaser *et al.*,  
807 1999), além de fatores inerentes à fisiologia da raça. Em artigo de revisão, comparando as  
808 raças Nelore e Holandesa, são mostradas diferenças nos hormônios circulantes e metabólitos,  
809 na morfologia e dinâmica ovariana, bem como na produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, as  
810 quais independem da lactação e da dieta (Sartori *et al.*, 2016).

811       A raça Bonsmara apresentou os melhores resultados de prenhez, sendo 47 e 50%  
812 quando se avaliou o genótipo, respectivamente, da doadora e receptora, no entanto na  
813 literatura consultada não há dados científicos relacionados ao desempenho desta raça na PIV.  
814 A taxa de produção embrionária foi avaliada entre raças e a taxa de blastocisto observada no  
815 Bonsmara foi de 41% (Silva *et al.*, 2014). A raça Bonsmara, originária da África do Sul, é

816 taurina adaptada, proveniente do cruzamento de três raças que resultaram em um animal de  
817 eficiência funcional, ou seja, extremamente fértil, dócil e rústico (Beefpoint, 2013). O oposto  
818 do resultado no Bonsmara foi observado na raça Senepol que apresentou a menor taxa de  
819 prenhez, apenas 26%. Este resultado corrobora com o resultado baixo de produção de  
820 blastocisto de apenas 14,4% provenientes de dados compilado por nós e ainda não publicados.  
821 Porém, em outro estudo não foi detectado efeito da raça na porcentagem de prenhez, sendo de  
822 39,1% (n = 801) para os embriões da raça Nelore e de 37,6% (n=705) para os da raça Senepol  
823 (Andrade et al., 2000). Diante de resultados tão conflitantes e sem outros para comparar,  
824 podemos inferir que esta baixa taxa se deve a linhagem dos animais, pois no presente trabalho  
825 todas as doadoras e receptoras foram originárias de apenas uma propriedade.

826 Muitos dos fatores apontados no presente estudo, não podem ser mudados ou  
827 aprimorados por novas descobertas, portanto a conscientização do cliente, sobretudo no que  
828 se refere às particularidades raciais e sua adequação às melhores épocas do ano, deve ser clara  
829 visando obter resultados mais consistentes no uso desta biotécnica em larga escala.

830

#### 831 **4. Conclusão**

832 Concluimos que o genótipo, das doadoras e receptoras, influencia fortemente no  
833 sucesso do emprego da OPU-PIV em larga escala e pode ser, em parte, explicada pela  
834 variação sazonal observada nas taxas de prenhez. Outros fatores que corroboram com a alta  
835 variabilidade dos resultados comerciais é o estágio embrionário no momento da inovulação e  
836 em menor intensidade o tipo de sêmen utilizado (sexado vs convencional).

837

#### 838 **Referências Bibliográficas**

839 Alexander, V.S. 2010. Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and  
840 malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to  
841 hormones. J. Exp. Biol., 213, 2125-2130.

842

843 Andrade, G.A., Fernandes, M.A., Knychala, R.M., et al. 2000. Fatores que afetam a taxa de  
844 prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Rev. Bras. Reprod. Anim. 36,  
845 66-69.

846

847 Avery, B., Greve, T., 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro*  
848 insemination. Theriogenology, 44 (6), 871-878.

849

850 Badinga, L., Collier, R.J., Thatcher, W.W. et al., 1985. Effects of climatic and management  
851 factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. J. Dairy Sci. 68, 78-85.

852

853 BeefPoint. 2013. Bonsmara: o “britânico dos trópicos” pelas características zootécnicas  
854 [Projeto Raças]. Disponível em: [http://www.beefpoint.com.br/bonsmara-o-britanico-dos-](http://www.beefpoint.com.br/bonsmara-o-britanico-dos-tropicos-pelas-caracteristicas-zootecnicas-projeto-racas/)  
855 [tropicos-pelas-caracteristicas-zootecnicas-projeto-racas/](http://www.beefpoint.com.br/bonsmara-o-britanico-dos-tropicos-pelas-caracteristicas-zootecnicas-projeto-racas/) (Accessed 3 Mai. 2018).

856

857 Binelli, M., Thatcher, W.W., Mattos, R. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in  
858 cattle. Theriogenology. 56,1451-1463.

859

860 Bueno, A.P., Beltran, M.P., 2008. Produção *in vitro* de embriões bovinos. Rev. Cient. Eletron.  
861 Med. Vet. 6,11. <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-R183.pdf>.  
862 (Accessed 15 Sept. 2017).

863

864 Cavestany, D., EL-Wishy, A.B., Foote, R.H., 1985. Effect of season and high environmental  
865 temperature on fertility of holstein cattle. J. Dairy Sci. 68, 1471-1478.

866

- 867 Dayan, A., Watanabe, M.R, Meirelles, F.V. et al., 2000. *Bos indicus* and *Bos taurus in vitro*  
868 produced embryos develop similarly in tropical conditions. *Theriogenology*. 53, 348.  
869
- 870 De Rensis, F., Marconi, P., Capelli, T., et al.. 2002. Fertility in postpartum dairy cows in  
871 winter or summer following estrous synchronization and fixed time A.I. after the induction of  
872 an LH surge with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin  
873 (hCG). *Theriogenology*. 58, 1675 – 1687.  
874
- 875 Ealy, A.D., Drost, M., Hansen, P.J. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to  
876 adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2899-2905.  
877
- 878 Gonella-Diaza, A.M., Holguín, D., MONTAÑA, D. et al. 2013. Corpus luteum diameter and  
879 embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17,521  
880 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo production program. *Anim.*  
881 *Reprod.* 10, 106-111.  
882
- 883 Goodhand, K.L., Watt, R.G., Staines, M.E. et al., 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro*  
884 embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH  
885 treatment. *Theriogenology*. 51, 951-961.  
886
- 887 Greve, T., Avery, B., Callesen, H. 1993. Viability of *in vivo* and *in vitro* produced bovine  
888 embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 164-169.  
889
- 890 Greve, T. 1992. *In vitro* embryotechnologies in cattle with particular reference to their use in  
891 cattle breeding schemes. *Reprod. Dom. Anim.* 27, 22-28.

892

893 Hansen, P.J, Ealy, A.D. 1991. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of  
894 pregnancy in cattle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1.,  
895 Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 108-119.

896

897 Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle.  
898 Theriogenology, 56,1401-1415.

899

900 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012.  
901 <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de>  
902 [noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie\\_historica.html/](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica.html/)  
903 (accessed 9 Out 2017).

904

905 Isag – International Society of Animal Genetics. 2006, Proceedings, Porto Seguro. Bahia,  
906 Brasil.

907

908 Lonergan, P., Fair, T., 2008. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts.  
909 Theriogenology. 69, 17-22.

910

911 Miki Sakatani. 2017. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced  
912 *in vitro*. J. Reproduc. Develop. 63, 4.

913

914 Morotti, Sanches, B.V, Pontes J.H.F., Basso, A.C., E.R. et al. 2014. Pregnancy rate and birth  
915 rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos*  
916 *indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. Theriogenology. 81, 696–701.

917

918 Nasser, L.F.T., Sá Filho, M.F., Ayres, H., et al. (2009). Factors influencing the *in vitro*  
919 embryo survival after fixed-time embryo transfer. In: 'International Symposium of Animal  
920 Reproduction, Argentina. (Ed. G.A. Bó.) (IRAC: Cordoba.).

921

922 Pellegrino, C., Campolina J.P., Seneda M.M. et al. 2016. Use of sexed sorted semen for fixed-  
923 time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*-produced embryos in  
924 cattle. *Theriogenology*. 86 (3), 888-893.

925

926 Peterson, A.J., Lee, R.S., 2003. Improving successful pregnancies after embryo transfer.  
927 *Theriogenology*. 59, 687-697.

928 Pires, M.F.A., Ferreira, A.M., Saturnino, H.M., et al., 2002. Pregnancy rate in holstein  
929 females confined in free stall, in summer and winter. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 54, 57-63.

930

931 Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C. et al. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production  
932 and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus* and indicus-taurus dairy cows using sexed  
933 sperm. *Theriogenology*, 74, 1349-1355.

934

935 Rodrigues, C. A., Ayres, H., Ferreira, R. M., et al., 2007. Comparison of pregnancy rates after  
936 artificial insemination or embryo transfer in high producing repeat breeder Holstein cows.  
937 Annual meeting Brazilian Embryo Technology Society. *Acta Sci. Vet.*, 35, 1255. [Abstract]

938

939 Sartori, R., Gimenes, L.U., Monteiro Junior, P.L.J., et al. (2016). Metabolic and endocrine  
940 differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of  
941 nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86, 32-40.

942

- 943 Silva, J.J., Pereira, J.F.S., Fernandes, M.B., et al., 2014. Produção *in vitro* de embriões de  
944 diferentes raças bovinas. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient. 12,61. [Abstract]  
945
- 946 Schneider, H.J. Jr., Castleberry, R.S, Griffin, J.L. 1980. Commercial aspects of bovine  
947 embryo transfer. Theriogenology. 13, 73-85.  
948
- 949 Taneja, M., Bols, P.E.J., Velde, V., 2000. Development competence of juvenile calf oocytes  
950 *in vitro* and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotrooin  
951 stimulation. Bio. Reprod., Champaingn. 62, 206-213.  
952
- 953 Thibier, M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction:  
954 current methods and perspectives. Reprod. Nutr. Dev. 45, 235-242.  
955
- 956 Torres-Júnior, J.R., Pires, M.F, Sá W.F., et al. 2008. Effect of maternal heat-stress on  
957 follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. Theriogenology. 69,155-166.  
958
- 959 Varago, F.C, Mendonça, L.F, Lagares, M.A., 2008. Produção *in vitro* de embriões bovinos:  
960 estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. Rev. Bras. Reprod. Anim.  
961 32, 100-109.  
962
- 963 Viana, J.H.M, et al. 2012. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry.  
964 Anim. Reprod. 9,00-00.  
965
- 966 Wright J. 1998. Photomicrographic illustration of embryo codes. In: Stringfellow DA, Seidel  
967 SM, editors. Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd ed, Savory, IL:  
968 International

969

970 Yaser, M.A., Webb, D.W., Hansen, P.J. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-Day  
971 nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in a hot climate. J. Dairy Sci. 82,  
972 2611-2616.

973

## ANEXO 1 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO



ISSN 1678-4162 versão  
online

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

### Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

### Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz).

### Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

## Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

## Tipos de artigos aceitos para publicação

### Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

### **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

### **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

## **Preparação dos textos para publicação**

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

## **Formatação do texto**

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no

corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

## Seções de um artigo

**Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

**Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

**Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

**Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco e no mínimo duas\*. \* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

**Introdução:** Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

**Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

**Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

*Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

*Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1),

mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

**Nota:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

**Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

**Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

**Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

**Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

### Como referenciar:

#### 1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

*Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

*Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

**2. Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**4. Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

### Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão

serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.  
**OBS.:** Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br) comunicando tal necessidade.

#### SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

#### Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

**Caixa Postal 567**  
**30123-970 Belo Horizonte MG Brasil**  
**Tel: +55 31 3409-2042**  
**Tel: +55 31 3409-2041**



[abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br)

## ANEXO 2 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO



## ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

## AUTHOR INFORMATION PACK

## TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>



ISSN: 0378-4320

## DESCRIPTION

*Animal Reproduction Science* publishes original research and timely reviews on topics relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the study reveals new information that impacts our basic understanding of the biology or manipulation of reproduction applicable to the animals listed above.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

*Animal Reproduction Science* has decided not to publish papers that exclusively examine the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, it will consider papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

Authors with any concerns are encouraged to contact the journal to enquire about the suitability of the content of their paper for [submission](#). *Animal Reproduction Science* has no page charges and only publishes papers after rigorous peer review.

## AUDIENCE

---

Research Workers in Animal and Human Reproduction, Animal Health Workers.

## IMPACT FACTOR

---

2016: 1.605 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Biological Abstracts

Current Awareness in Biological Sciences PubMed

MEDLINE®

Animal Breeding Abstracts Bibliography  
of Reproduction

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences Scopus

Elsevier BIOBASE

## EDITORIAL BOARD

---

### *Co-Editors-in-Chief*

**G.N. Hinch**, University of New England, Armidale, NSW, Australia

**J.E. Kinder**, Ohio State University, Wooster, OH, USA

### *Editorial Advisory Board*

**B.M. Alexander**, Laramie, WY USA

**L.L. Anderson**, Ames, IA USA

**C. Aurich**, Vienna, Austria

**F.W. Bazer**, College Station, TX USA

**H. Cardenas**, Columbus, OH USA

**J.F. Cavalieri**, Townsville, QLD, Australia

**D. Cavestany**, Montevideo, Uruguay

**P. Comizzoli**, Washington, DC USA

**R.A. Cushman**, Clay Center, NE USA

**R.A. Dailey**, Morgantown, WV USA

**S.P. de Graaf**, Sydney, NSW, Australia

**J.A. Delgadillo**, Torreón, Coahuila, Mexico

**M.G. Diskin**, Athenry, County Galway, Ireland

**M-A. Driancourt**, Chateaufeuf sur Sarthe, France

**A.D. Ealy**, Gainesville, FL USA

**W.L. Flowers**, Raleigh, NC USA

**J. Ford**, Maryville, MO, USA

**D.L. Garner**, Reno, NV USA

**C.L. Gasser**, Cedar City, UT USA

**W.V Holt**, London, UK

**K. Imakawa**, Tokyo, Japan

**A.L. Johnson**, University Park, PA USA

**R.J. Mapletoft**, Saskatoon, SK, Canada

**J.F. Mee**, Fermoy, County Cork, Ireland

**J.C.F. Moraes**, Bage, Brazil

**T. Nagai**, Taipei, Taiwan, China

**N. Parvizi**, Neustadt, Germany

**J.R. Pursley**, East Lansing, MI USA

**J.P. Ravindra**, Bangalore, India

**R.R. Santos**, Lelystad, Netherlands

**D.C. Sharp**, Gainesville, FL USA

**Y-L. Shiue**, Kaohsiung, Taiwan

**J.F. Smith**, Auckland, New Zealand

**D.L. Thompson**, Baton Rouge, LA USA

**A. Turner**, Burwood, VIC Australia

**S. Uzbekova**, Nouzilly, France

**M. Yeste**, Girona, Spain

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of Paper*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

*Original Research Papers* should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* Review manuscripts should fit within the scope for the journal and be of current interest in the realm of animal reproduction in those species on which the journal focuses. Submission of Review Manuscripts to Animal Reproduction Science is encouraged. The manuscripts may be submitted without invitation or be invited reviews and should be submitted using the same process as that for Original Research manuscripts.

#### *Contact details for submission*

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### *Ensure that the following items are present:*

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures inprint *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

*Revisions*

Please ensure when submitting a revision to complete and include the '[Revision Checklist](#)' file.

**BEFORE YOU BEGIN**

*Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

*Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access**
- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

*Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

*Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

*Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

*Submission*

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

*Submit your article*

Please submit your article via <https://www.eviser.com/profile/api/navigate/ANIREP>.

*Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## PREPARATION

*Peer review*

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

*Article structure*

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references,

tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### *Abstract*

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

### Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

### Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

*Artwork Electronic*  
*artwork General*  
*points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

*You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.*

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### *Please do not:*

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Tables*

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

*Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-reproduction-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp.281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### *Video*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### *AudioSlides*

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words

and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### *Data visualization*

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

#### *Supplementary material*

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

#### *Research data*

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

##### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

##### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

*Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## AFTER ACCEPTANCE

### *Online proof correction*

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### *Offprints*

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>