

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

POUCAS CAMADAS DO CUMULUS E SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS NA TIFOI

**André Bianchini Covre, Rudiery Lauson de Paula Reis, José de Oliveira
Carvalho Neto, Michele Ricieri Bastos**

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre - ES,
Brasil, andrebcvet@gmail.com, rudieryvet@gmail.com, joseocneto@hotmail.com,
michelericieribastos@gmail.com

Resumo

Na atualidade, duas principais biotecnologias de reprodução são empregadas na produção de embriões bovinos: a produção *in vivo* através da superovulação (SOV-TE) e a produção *in vitro*, PIVE. Ambas abrangem vantagens e desvantagens específicas. A SOV-TE se destaca ao viabilizar embriões de alta qualidade, porém, demanda um período mínimo de 40 dias entre os protocolos, dificultando sua aplicação em larga escala. Enquanto a PIVE permite facilidade em produção por grande escala, com coletas semanais, mas, a qualidade embrionária fica aquém da produção *in vivo*. Como terceira opção para a produção de embriões *in vivo* surge a Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI), esta, permite toda sua execução dentro da própria fazenda. O objetivo deste estudo é de avaliar se a injeção de células do cumulus com poucas camadas influencia positivamente na taxa de recuperação de estruturas após TIFOI em fêmeas da raça Girolando. Utilizou-se de 09 fêmeas mestiças com injeção de oócitos com poucas células do cumulus (3-4 camadas), resultando em 13% (21 estruturas) de taxa de recuperação. As taxas continuam voláteis, mesmo com uso de poucas camadas do cumulus.

Palavras-chave: Complexo cumulus-oophorus (CCOs). Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos. Recuperação de Estruturas.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

É sabido que para aumentar a produtividade do rebanho brasileiro é essencial que se tenha inserção de tecnologias nos sistemas produtivos, incluindo tecnologias de reprodução assistida, tanto para sistemas de produção de corte como de leite.

Dentre as biotecnologias da reprodução temos a inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vivo* de embriões bovinos com superestimulação ovariana (SOV-TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Todas elas estão disponíveis comercialmente para otimizar o melhoramento genético do rebanho e consequentemente aumentar a produtividade (BARUSELLI *et al.*, 2007).

No Brasil, estas tecnologias são utilizadas por quase todo o território nacional, sendo que em 2019 um total aproximado de 304.269 embriões (VIANA, 2021). Destes, 285.552 (93,8%) embriões foram produzidos *in vitro* e 18.717 (6,2%) *in vivo*. Isto comprova o grande potencial que o país possui para o uso das biotecnologias da reprodução e a demanda pela multiplicação mais rápida e eficiente de animais com um potencial genético (SPRICIGO e DODE, 2016).

Segundo Spricigo e Dode (2016), apesar de a SOV-TE produzir embriões de excelente qualidade, o intervalo de 40 dias necessário entre os protocolos é um limitador da eficiência desta técnica. Outro fator limitante da SOV-TE é o desgaste da doadora de genética devido aos protocolos com uso de hormônio foliculo estimulante (FSH), resultando em alterações dos padrões fisiológicos da dinâmica folicular. Entretanto, esta tecnologia apresenta menor custo, menor estrutura laboratorial e menos mão de obra. Enquanto isso, na PIVE a doadora pode ser aspirada semanalmente para a coleta de complexos cumulus oócito (CCO) sem prejuízos aos padrões fisiológicos da dinâmica folicular. No entanto, a PIVE demanda uma complexa infraestrutura de laboratório para a produção do embrião, sendo necessárias instalações, equipamentos, meios de cultivo e mão de obra especializada. Além

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

disto, os embriões produzidos apresentam qualidade inferior quando comparados aos produzidos *in vivo*.

Pensando nestas vantagens e desvantagens Spricigo *et al.* (2016) descreveram uma nova biotecnologia da reprodução assistida, que une as vantagens da SOV-TE e da PIVE, a qual denomina-se Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI). A TIFOI permite a produção *in vivo* de embriões, sem necessidade de utilizar protocolos hormonais a base de FSH na doadora e obter embriões de melhor qualidade, quando comparada à PIVE. Além disso, elimina alguns fatores limitantes da PIVE, como, a necessidade de uma estrutura de laboratório para produção de embrião ou grandes distâncias de transportes dos CCOs e embrião entre a fazenda e o laboratório.

A produção de embriões bovinos após injeção de oócitos em um folículo pré-ovulatório, seguida por inseminação artificial foi primeiramente relatada por Bergfelt *et al.* (1998).

Desta forma, apesar de a técnica ter sido desenvolvida na década de 90, as primeiras gestações em bovinos, que resultaram em nascimento, só ocorreram em 2015 (KASSENS *et al.*, 2015). Todavia, esses autores utilizaram oócitos obtidos de ovários de abatedouro, com os CCOs submetidos à maturação *in vitro*, previamente à injeção intrafolicular.

Assim sendo, o nascimento dos primeiros bezerros produtos da TIFOI, com todo o processo realizado *in vivo*, dispensando totalmente a utilização de equipamentos e meios laboratoriais de PIVE foi descrita por Spricigo *et al.* (2016). A técnica foi registrada no INPI sob a marca TIFOI (No. processo 911925597).

Desta forma, objetivou-se com este estudo avaliar se a injeção intrafolicular utilizando CCOs com menor quantidade de células do cumulus pode influenciar na taxa de recuperação de estruturas após a TIFOI.

Metodologia

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – “Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI): otimização e validação da técnica em gado de leite” registrada sob o N.º 010/2020. O experimento foi realizado na Área Experimental da UFES, com suporte laboratorial do Laboratório de Reprodução Animal, situado no Hospital Veterinário, CCAE-UFES, campus de Alegre.

Foram selecionadas 09 vacas mestiças Girolando, não lactantes, com escore de condição corporal que variava de 3,5 a 4,5 sob escala 1-5, e peso vivo de 445 ± 97 kgs. Os animais eram mantidos em piquetes com capim *Brachiaria decumbens*, em sistema semi-intensivo, com suplementação de ração proteinada e silagem de milho, com sal mineral e água *ad libitum*.

Os oócitos foram obtidos a partir de Ovários de fêmeas bovinas coletados em abatedouro ABAV-Abatedouro Atílio Vivacqua Ltda. – ES, CNPJ 02.838.996/0001-34. Os ovários foram coletados e transportados ao laboratório a 37°C, imersos em solução salina (0,9% NaCl). Foram aspirados os folículos que apresentavam tamanho de 3 a 8 mm, com uso de seringa de 10 mL e agulha 18G. A partir disso, eram depositados em tubos cônicos de 15 mL. Então, os complexos cumulus oócitos (CCOs) foram rastreados e classificados de 1-4 de acordo com sua morfologia citoplasmática e número de camadas de células do cumulus.

Para obter-se um folículo pré-ovulatório com diâmetro ≥ 10 mm as fêmeas bovinas foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro. Este, teve início com a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Sincrogest 1g, Ourofino, Cravinhos – SP) associado a injeção (i.m.) de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Sincrodiol, Ourofino, Cravinhos – SP). Após 8 dias fez-se a remoção do implante de P4, seguido da aplicação de 2 mL (i.m.) de Prostaglandina F2 α (PgF2 α ; 0,5 mg de Cloprostenol Sódico, Ourofino, Cravinhos – SP). A indução da ovulação foi realizada com o uso de 1 mg de BE no dia 9 (D9). No dia 10 as vacas foram avaliadas com ultrassom de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Shenzhen, China).

Quanto a injeção intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI) foi utilizado neste grupo apenas oócitos que apresentavam menores quantidades de células do cumulus, ou seja, CCOs grau 2. O procedimento de TIFOI foi realizado de acordo como descrito por Spricigo *et al.* (2016), com modificações.

Os animais foram alocados em bretes individuais, consequentemente foram higienizados e anestesiados a partir de epidural baixa, utilizando aproximadamente 3 mL de Lidocaína.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A TIFOI foi realizada com um transdutor micro-convexo, acoplado a uma guia transvaginal (WTA, Brasil). A guia continha um mandril montado em um sistema fechado, possuindo em uma extremidade uma seringa de insulina, e na extremidade oposta, uma agulha 27G.

Os CCOs foram alocados por meio de pressão negativa dentro da agulha de injeção em 60 µL meio TCM 199 acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A guia foi posicionada no fórnix vaginal, ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante. A agulha perfura então o fórnix e a parede do folículo dominante, injetando então, o volume da agulha que continha os CCOs.

Sete dias após TIFOI as fêmeas ovuladoras foram submetidas à lavagem uterina para colheita dos embriões. Foi realizada anestesia epidural com uso de lidocaína e posteriormente higienização da região perineal. A técnica de colheita realizada foi não cirúrgica, através da lavagem uterina com 1 litro de *Dulbecco Buffered Saline* (DPBS) por animal, utilizando Sonda de Foley (No. 18, Rusch, EUA), acoplada a um Sistema em "Y". O lavado foi recolhido em filtro 75 µm (WTA, Brasil) e transportado ao laboratório, onde as estruturas foram rastreadas e avaliadas. Após o final da lavagem uterina, foi realizada a aplicação de 2 mL de Prostaglandina, para promover a luteólise dos CLs ds vacas ovuladoras.

Resultados

Dos 9 protocolos de sincronização da ovulação realizados nos 9 animais, foi comprovada a ovulação de 8 animais (88,8%), sendo que, o animal em que não apresentou ovulação foi removido do estudo. Os demais dados descritivos são encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro médio do FD, taxa de ovulação, número de CCOs injetados e taxas de recuperação de estruturas após TIFOI realizada utilizando poucas células do cumulus.

Grupo	Média de Diâmetro FD - D10 mm	Média de Ovulação %	Animais com Recuperação n (%)	Animais com Recuperação -1 n (%)	Total de CCO's Injetados n	Média de CCO's Injetados n	Estruturas Recuperadas n	Taxa de Recuperação de Estruturas %
Poucas CCs	14,63±1,38	88,8 (8/9)	5 (62,5)	3 (37,5)	162	20,25±0,34	21	13%

Fonte: os autores.

As informações descritivas da classificação das estruturas recuperadas, são representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estruturas totais recuperadas e a classificação das estruturas.

Grupo	Classificação das Estruturas					
	Estruturas Coletadas n	ZP n (%)	NF n (%)	Clivados n (%)	Degenerados n (%)	Embrião n (%)
Poucas CCs	21	2 (9,5)	12 (57,1)	7 (33,3)	5 (23,8)	2 (9,5)

Fonte: os autores.

Discussão

TIFOI surge como uma alternativa para a produção *in vivo* de embriões bovinos. Entretanto, apesar da eficácia já comprovada, esta biotecnologia ainda apresenta baixa eficiência, com taxa de embriões viáveis recuperados variando de 12 a 27% (KASSENS *et al.*, 2015; SPRICIGO *et al.*, 2016; VIEIRA, 2022) em relação ao número total de CCO's injetados. Parte destes baixos resultados pode estar ligado a problemas na captação pelas fimbrias do infundíbulo do conjunto de CCO's injetados no folículo pré ovulatório no momento da TIFOI. Acredita-se que, semelhantemente à maturação *in vitro* (YOKOO;

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SAKO, 2004), possa estar ocorrendo a formação de um aglomerado dos vários CCOs injetados após sofrerem maturação oocitária com subsequente expansão das células do cumulus, fazendo com que ocorra essa adesão entre os CCOs. Com base nesta hipótese decidiu-se avaliar, neste estudo, se a quantidade de células do cumulus (CCs) presente nos oócitos injetados poderia influenciar na taxa de recuperação após TIFOI, tanto por uma possível influência na capacidade do folículo ovulatório em expulsar o aglomerado de oócitos, como também por uma possível influência na capacidade das fímbrias do infundíbulo em captar os aglomerados de CCOs na sua totalidade.

O processo de captação do oócito ocorre mediante a expansão das células do cumulus, quando uma elevada quantia de glicosaminoglicanos (GAG's) são sintetizados e secretados, estas moléculas interagem com alguns componentes específicos da matriz, formando uma rede de matrizes viscoelásticas no espaço extracelular, facilitando o desprendimento do CCO da parede folicular, o qual é capturado pelas fímbrias tubáricas (CHEN *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 1999; TSAFRIRI, 1995). Na tuba uterina, transportado pelo batimento ciliar e pela musculatura lisa, o CCO permanece ligado ao epitélio por um período de tempo variável (COY *et al.*, 2012).

Um outro ponto que, acredita-se, que pode ser crítico para o sucesso da TIFOI é a necessidade de manipulação do ovário contendo o folículo pré ovulatório, horas antes da ovulação. Não se sabe o quanto essa manipulação pode ou não comprometer o correto posicionamento das fímbrias do infundíbulo da tuba uterina em relação ao ovário. Caso essa manipulação possa causar mudança nas fímbrias que recobrem o ovário, a captação poderá ser negativamente impactada e refletir em uma menor taxa de recuperação após a TIFOI.

Quanto a baixa taxa de recuperação de estruturas, é relatada por diferentes trabalhos sendo altamente variável, de 2,6% (VIEIRA, 2022) a 17,3% (HOELKER *et al.*, 2017). Além disso, observa-se que a quantidade de não fecundados e embriões degenerados foi de 12 estruturas (57,1%) e 5 (23,8%). Isto, pode ser relacionado a falha na aquisição de competência dos oócitos durante a maturação e/ou devido ao ambiente tubárico ser inadequado para que ocorram os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial.

Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, Ruas (2022), avaliando a recuperação de estruturas na tuba uterina após TIFOI utilizando dois grupos injetando 5 e 50 CCOs, foi identificado a presença de CCOs no interior da cavidade luteal 2,5 dias após a ovulação. Isto demonstra que alguns CCOs podem ficar retidos no interior do folículo no momento da ovulação em ambos os grupos experimentais.

Como a retenção de CCOs no interior do folículo foi identificada tanto no grupo que recebeu 5 ou 50 CCOs, sugere que esta provável retenção não seja relacionada exclusivamente à quantidade de CCOs injetados. Uma outra provável hipótese é que tal fato pode estar ocorrendo devido a velocidade de liberação do fluido folicular no momento da ovulação. O início da evacuação folicular é definido quando a área antral apresenta redução de 10% ou mais em um período de 1 segundo, enquanto a completa evacuação é definida como a perda de área antral detectável. Em estudo de Kot e Ginther (1999) 4 de 7 novilhas Holandesas apresentaram rápida liberação do fluido folicular (58 a 89% em 4 segundos), enquanto outras 3 novilhas apresentaram liberação lenta (17 a 35% em 4 segundos). Além disto, o tempo de liberação total do fluido folicular variou de 6 segundos a 14,5 minutos. Segundo os autores, esta variação pode ocorrer quando há uma liberação precoce do CCO no fluido liberado ou por uma obstrução transitória causada pelo CCO que estaria próximo ao local de ruptura da parede folicular. Desta forma, acredita-se que a presença de vários CCOs no interior do folículo após a TIFOI, poderia aumentar a probabilidade desta obstrução ocorrer, dificultando a liberação total ou parcial dos CCOs injetados.

Desta forma é possível que a baixa taxa de recuperação encontrada em ambos os grupos seja devido à retenção de alguns CCOs no interior do folículo, devido à probabilidade de uma lenta liberação do fluido folicular, consequência de uma possível obstrução causada pelo aglomerado de CCOs após TIFOI. Embora até o presente momento não haja estudos avaliando a velocidade de liberação do fluido folicular em folículos submetidos à TIFOI, é possível que estes tenham uma liberação mais lenta que o esperado. Dados observacionais de nosso grupo de pesquisa têm identificado que no momento da TIFOI, alguns folículos apresentam ligeira redução de seu volume. Com isso pode ocorrer uma diminuição da pressão intrafolicular, levando a liberação de seu fluido de forma lenta no momento da ovulação, comprometendo a liberação total dos CCOs injetados.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Estudos prévios têm indicado que na técnica de TIFOI, os CCOs precisam permanecer no folículo da vaca ovuladora por 12 a 22h, para atingirem a completa maturação (SPRICIGO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2019; VIEIRA, 2022). Sabe-se que o fluido folicular é um fluido complexo composto por lipídeos, água, eletrólitos, aminoácidos, xenobióticos, nucleotídeos, carboidratos e vitaminas, peptídeos e substratos energéticos (HUNG *et al.*, 2015; ALRABIRAH *et al.*, 2023), além de apresentarem vesículas extracelulares (HUNG *et al.*, 2015), micro RNA (GOSDEN *et al.*, 1988), cell free DNA (SCALICI *et al.*, 2014; ICHIKAWA *et al.*, 2019). Em um estudo de Alrabirah *et al.* (2023) foram caracterizados aproximadamente 634 metabólitos no fluido folicular, de forma que 67 metabólitos eram influenciados diretamente pelo estágio de desenvolvimento folicular.

Acredita-se também, que a presença de vários CCOs no interior de um folículo que, fisiologicamente, abrigaria apenas 01 CCO, poderia provocar uma modificação dos componentes do fluido folicular. Desta forma, apesar de estudos indicarem que o tempo de permanência dos CCOs no interior do folículo seja suficiente para promover a expansão das CC e a maturação nuclear deste oócito, por verificação de seu estágio em metáfase II, é possível que não ocorram outras alterações importantes, especialmente ligadas a maturação citoplasmática ou molecular. Desta forma, o processo de fecundação e principalmente do desenvolvimento embrionário inicial, pode ser comprometida.

Conclusão

Os resultados sugerem que as recuperações de estruturas na TIFOI continuam variáveis mesmo utilizando menores quantidades de camadas de células do cumulus, necessitando de novos estudos para reavaliar a técnica.

Referências

ALRABIAH, NOOF ABDULRAHMAN; SIMINTIRAS, CONSTANTINE A.; EVANS, ALEXANDER C. O.; LONERGAN, PATRICK; FAIR, TRUDEE. Biochemical alterations in the follicular fluid of bovine peri-ovulatory follicles and their association with final oocyte maturation. **Reproduction & Fertility**, [s. l.], 2023.

BARUSELLI, PIETRO SAMPAIO; GIMENES, LINDSAY UNNO; SALES, JOSÉ NÉLIO DE SOUSA. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, abr/jun. 2007.

BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**. 1998.

FARIA, O. A. C.; *et al.* Effect of the anticipation of intrafollicular transfer of immature oocytes (IFIOT) in the nuclear maturation of bovine oocyte. In: SBTE, 2019, Ilha de Comandatuba, BA. **PROCEEDINGS OF THE 33rd ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY**. Ilha de Comandatuba: ResearchGate, 2019. p. 587.

GOSDEN R. G.; HUNTER R. H.; TELFER E.; TORRANCE C.; BROWN N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **J Reprod Fertil**. 1988; 82:813–825.

HOELKER, M.; KASSENS, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI C.; TESFAVE D., NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD-HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, 49. doi:10.1016/j.theriogenology. 2017.

HUNG, WEI-TING; HONG, XIOMAN; CHRISTENSON, LANE K.; MCGINNIS, LYNDIA K. Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. **Biology of Reproduction**, [s. l.], 2015.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ICHIKAWA, Kana; SHIBAHARA, Hidenori; SHIRASUNA, Komei; KUWAYAMA, Takehito; IWATA, Hisataka. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, [s. l.], 26 nov. 2019.

KOT, K.; GINTHER, O. J. Ultrasonic characterization of ovulatory follicular evacuation and luteal development in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], 1999.

RUAS, FELIPE LOPES. **RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS NA TUBA UTERINA APÓS TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OÓCITOS IMATUROS (TIFOI) COM DIFERENTE NÚMERO DE COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO INJETADOS**. Orientador: José de Oliveira Carvalho Neto. 2023. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, [S. l.], 2022.

SCALICI, E.; TRAVER, S.; MOLINARI, N.; MULLET, T.; MONFORTE, M.; VINTEJOUX, E.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. **Human Reproduction**, [s. l.], 2014.

SILVA, V. A.; *et al.* Inhibition of meiosis resumption in bovine oocytes to be used in the intrafollicular transfer of immature oocyte (TIFOI). *In*: SBTE, 2018, Florianópolis. **PROCEEDINGS OF THE 32ND ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY**. Florianópolis: ResearchGate, 2018. p. 456.

SPRICIGO, JOSÉ FELIPE WARMLING; DODE, MARGOT ALVES NUNES. **Transferência Intrafollicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos**. 353. ed. Brasília: [s. n.], 2016.

SPRICIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; CAIXETA, F. M. C.; RODRIGUES, S. A. D.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Intra-follicular immature oocyte transfer (IFIOT) derived embryos result in pregnancies in cattle. **Animal Reproduction**, v.13, n.3, p.471, 2016.

VIANA, JOÃO HENRIQUE MOREIRA. Estatísticas da produção e transferência de embriões no período pré-pandemia: Qual o real tamanho do mercado brasileiro?. **O Embrião**, [S. l.], p. 1-40, 1 set. 2021.

VIEIRA, ADRIANA FILÓ DE ALMEIDA. **TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OÓCITOS IMATUROS (TIFOI) E A TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM VACAS ZEBUÍNAS**. 2022. Dissertação (Magister Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 2022.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo, por permitir a realização do estudo.
À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).
À Ourofino Saúde Animal pelo fornecimento de insumos e hormônios utilizados no decorrer do desenvolvimento da pesquisa.